

Paula Pennanen

SUKUPUOLIHORMONIEN VAIKUTUS  
NEUROFIBROOMAKASVAINTEN KEHITTÄMISESSÄ

Hyvinvointiteknologian koulutusohjelma  
Ylempi AMK  
2011

## Alkusanat

Tämä opinnäytetyö on tehty Turun yliopistolla Biolääketieteen laitoksella solubiologian ja anatomian osastolla. Opinnäytetyön tarkastajina ovat toimineet professori Juha Peltonen Turun yliopistolta, koulutusjohtaja Sirpa Sandelin Satakunnan ammattikorkeakoulusta ja yliopettaja Raimo Pärssinen Turun ammattikorkeakoulusta. Opinnäytetyön on ohjannut professori Juha Peltonen.

Haluan kiittää ohjaajaani Juha Peltosta mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta ja hyvästä ohjauksesta. Haluan kiittää myös Sirpa Sandelinia ja Raimo Pärssistä opinnäytetyön tarkastamisesta sekä ihotautien erikoislääkäri Sirkku Peltosta yhteistyöstä. Kiitän myös kaikkia muita tutkimusryhmämme jäseniä ja muita henkilöitä, jotka ovat auttaneet opinnäytetyön teossa.

Turku, toukokuu 2011

Paula Pennanen

# SUKUPUOLIHORMONIEN VAIKUTUS NEUROFIBROOMAKASVAINTEN KEHITTÄMISESSÄ

Pennanen, Paula

Satakunnan ammattikorkeakoulu

Hyvinvointiteknologian koulutusohjelma, insinööri (ylempi AMK)

Toukokuu 2011

Ohjaajat: Pelttonen Juha, Sandelin Sirpa ja Pärssinen Raimo

Sivumäärä: 61

Liitteitä: 3

Asiasanat: Neurofibromatoosi NF1, Schwannin solu, estradioli, testosteroni, hCG, BrdU ELISA- määrittäminen

Opinnäytetyön aiheena oli perehtyä perinnöllisen sairauden tyypin 1 neurofibromatoosi syntymekanismeihin. Sairauden aiheuttaa mutaatio NF1- geenissä. Geeni sisältää rakennusohjeet neurofibromiini kasvurajoitevalkuaiselle, joka on mukana solujen kasvun kontrolloinnissa. NF1 on yksi yleisimmistä autosomaalisesti dominantisti periytyvistä sairauksista. Sairauden ilmaantuvuus ympäri maailmaa on 1/3000 ja Suomessa arvioidaan olevan 1000 – 2000 NF1:a sairastavaa ihmistä. Sairaudesta ei voi parantua ja taudinkuva voi olla eri yksilöillä hyvinkin erilainen. Lähes kaikilla sairastuneista ilmenee iholla maitokahviläiskiä. Toisten taudinkuvaan saattaa kuulua kasvaimien aiheuttamia epämuodostumia kasvoissa, luuston alueen kehityshäiriöitä tai silmän värikalvolla olevia kyhmyjä. Neurofibroomat eli ihon hyvänlaatuiset hermon tukikudoksen kasvaimet ovat NF1 sairauden yksi keskeisimpiä tunnusmerkkejä. Kasvaimien koko ja määrä vaihtelevat suuresti erityisesti ihmisen eri ikäkausien hormonaalisten muutosten yhteydessä, kuten murrosiän, raskauden ja vaihdevuosien aikana.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää soluviljelymenetelmin ihon hyvänlaatuisten kasvaimien syntyä viljelemällä kasvaimista saatua solupopulaatiota ja erityisesti Schwannin soluja. Tavoitteena oli selvittää vaikuttaako kasvaimien syntyyn ja lisääntymiseen jokin hormonaalinen tekijä murrosiässä, raskauden ja vaihdevuosien aikana. Yhteisenä tekijänä ajatellaan olevan ihmisen sukupuolihormonit. Työni tarkoituksena oli suunnitella ja kehittää protokolla estradiolin, testosteronin ja hCG:n testaamiseen Schwannin soluilla.

Protokolla Schwannin solujen testaamiseen kehitettiin BrdU ELISA – määrittämisellä toimivaksi. Tutkimuksen tulokset antoivat uutta tietoa Schwannin solujen eri genotyyppien -/- ja +/- solukantojen käyttäytymisestä estradiolin, testosteronin ja hCG:n läsnä ollessa BrdU ELISA- määrittämisellä. Mielenkiintoista oli, että hormonit stimuloivat erityisesti -/- solujen kasvua. Se oli nähtävissä erityisesti 4. päivän kasvatustuloksissa jopa 200 prosentin kasvuna viljelmissä. 2. päivän kasvatuksissa solujen kasvu oli estradiolin ja testosteronin vaikutuksesta lisääntynyt 10 - 20 prosenttia. HCG inhiboi +/- solujen kasvua päivänä 4 jopa 15- 40 prosenttia. Tulokset osoittavat selkeästi, että NF1 -/- genotyypin Schwannin solut ovat erityisen herkkiä sukupuolihormonien vaikutuksille.

# INFLUENCE OF SEX HORMONES IN DEVELOPMENT OF NEUROFIBROMAS

Pennanen, Paula

Satakunta University of Applied Sciences

Welfare Technology, Master of Engineering

May 2011

Supervisors: Peltonen Juha, Sandelin Sirpa ja Pärssinen Raimo

Number of pages: 61

Appendices: 3

Keywords: neurofibromatosis NF1, Schwann cell, estradiol, testosterone, hCG, BrdU ELISA - test

---

The purpose of this thesis was to study the mechanism of inheritable disease type 1 neurofibromatosis. It is caused by mutations in the NF1 gene. The gene encodes the tumor suppressor protein neurofibromin which is involved in controlling of cell proliferation. NF1 is one of the most common autosomal dominant disorder. NF1 is affecting 1/3000 individuals worldwide and in Finland is estimated to be 1000 – 2000 NF1 patient. You cannot cure from the disease and the complications of NF1 vary between individuals. Nearly all NF1 patients have café-au-lait spots. Some patients might have deformed face caused by tumors, bones development disorder or nodules in the eye's iris. Neurofibromas are skin benign peripheral nerve sheath tumors and the central feature of NF1. The size and amount of the tumors vary a lot during people hormonal periods like adolescence, pregnancy and menopause.

The purpose of this study was to solve the origin of skin benign tumors with cell culture methods by culturing the cell population of tumors and specially Schwann cells. The aim was to investigate the factors in tumors increasing during adolescence, pregnancy and menopause. The common feature is thought to be human's sex hormones. The purpose of this study was to plan and develop a protocol to test estradiol, testosterone and hCG with Schwann cells.

The protocol for testing Schwann cells was developed with BrdU ELISA – test. The result of these studies gave new information about behavior of Schwann cells in two different genotypes -/- and +/- with estradiol, testosterone and hCG. It was interesting to see the effect of hormones especially in -/- cells. It was detected specific on day 4 cultures even 200 percent with increase in cell proliferation. Day 2 cultures cell proliferation was increased only 10 – 20 percent influence of estradiol and testosterone. HCG inhibited on day 4 cultures +/- cells proliferation even 15 – 40 percent. The results showed clearly that Schwann cells of -/- genotype are very sensitive to the influence of sex hormones.

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	8
2	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	10
3	IHMISEN HERMOSTO .....	11
3.1	Keskus- ja ääreishermosto .....	11
3.2	Hermosolu.....	11
3.2.1	Myeliinitupit.....	13
3.2.2	Synapsi .....	14
4	NEUROFIBROMATOOSI NF1 .....	14
4.1	Taudinkuva .....	14
4.1.1	Cafe-au-lait – läiskät .....	16
4.1.2	Muut komplikaatiot .....	16
4.2	Neurofibroomat.....	16
4.2.1	Neurofibroomien muodostuminen .....	17
4.3	NF1- geeni ja proteiini .....	20
4.4	NF1- mutaatiot .....	21
4.5	Perinnöllisyys.....	22
5	HORMONIT .....	23
5.1	Hormonien rakenne.....	23
5.2	Hormonien vaikutustavat .....	23
5.3	Gonadotropiinit .....	24
5.3.1	Gonadotropiinien erityksen säätely .....	24
5.3.2	Follitropiini (FSH) ja luteinisoiva hormoni eli lutropiini (LH).....	26
5.3.3	Istukkahormoni (hCG) .....	27
5.3.4	Estrogeeni.....	28
5.3.4	Testosteroni .....	29
6	SCHWANNIN SOLUT JA NIIDEN TUNNISTAMINEN.....	31
6.1	Schwannin solut ääreishermostossa.....	31
6.2	Schwannin solujen jakautumiseen vaikuttavia tekijöitä .....	32
6.3	Schwannin solujen viljelyssä huomioitavia asioita .....	32
6.4	Schwannin solujen testaus BrdU ELISA - määrittelyllä .....	33
7	TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT MENETELMÄT.....	34
7.1	Potilaat ja kasvaimet .....	34
7.2	Tutkimuksessa käytetyt aineet .....	35
7.3	Schwannin solujen viljely .....	37

7.4	Protokollan hakeminen BrdU ELISA-määritykselle ja hormonitestaukset .....	39
7.5	BrdU ELISA - määrittäminen .....	40
8	TUTKIMUKSEN TULOKSET .....	41
8.1	Schwannin solujen viljely .....	41
8.2	Protokollan hakeminen BrdU ELISA-määritykselle .....	42
8.3	Hormonitestaukset .....	48
9	YHTEENVETO JA POHDINTA .....	52
	LÄHTEET .....	55
	LIITTEET	

## Lyhenteet

BrdU	5-bromi-2-deoksiuridiini
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetyyli sulfoksidi
ELISA	Enzyme - linked immunosorbent assay
FBS	naudan sikiön seerumi (Eng. fetal bovine serum)
FSH	follitropiini
hCG	istukkahormoni eli koriongonadotropiini
LH	luteinisoiva hormoni
LOH	loss of heterozygosity
NF1	neurofibromatoosi 1
passage	solujen jako
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
RNA	ribonukleiinihappo

## 1 JOHDANTO

Tutkimuksessa käsitellään tyypin 1 neurofibromatoosi (NF1) oireyhtymän syntymekanismeihin. Sairautta kutsutaan myös nimellä von Recklinghausenin tauti. Tyypin 1 neurofibromatoosin aiheuttaa mutaatio NF1- geenissä. Geeni sisältää rakennusohjeet proteiinille nimeltä neurofibromiini. Tämä proteiini on mukana solujen kasvun kontrolloinnissa. Neurofibromatoosi on yksi yleisimmistä autosomaalisesti dominantisti periytyvistä sairauksista. Sairaalan perintötekijän läpäisevyys on 100 %, mikä tarkoittaa sitä, että tauti ilmenee kaikilla muuttuneen geenin kantajilla eli sairaus ei voi olla piilevänä. Sairaalan ilmaantuvuus ympäri maailmaa on 1/3000. Suomessa arvioidaan olevan 1000–2000 neurofibromatoosia sairastavaa ihmistä. Taudin esiintyvyydessä ei ole eroa maantieteellisten tai etnisten ryhmien välillä. Taudista ei voi parantua. (2, 3)

Neurofibromatoosin taudinkuva voi olla eri yksilöillä hyvinkin erilainen. Taudin vaikeusaste vaihtelee huomattavasti henkilöstä toiseen samankin perheen sisällä. Noin 10–20%:lla sairastuneista taudinkuva on hyvinkin vaikea hankalaine kasvaimineen. Lähes kaikilla sairastuneista ilmenee iholla maitokahviläiskä. Toisten taudinkuvaan saattaa kuulua kasvaimien aiheuttamia epämuodostumia kasvoissa, Lischin noduluksia silmän värikalvolla tai valenivelen muodostumista. Taudinkulun ennustaminen yksittäisen potilaan kohdalla on vaikeaa. Neurofibromatoosiin kuuluvat myös olennaisena osana neurofibroomat, jotka ovat ihon hyvänlaatuisia kasvaimia. Nämä kasvaimet koostuvat pääasiassa Schwannin soluista ja fibroblasteista. Ne sisältävät myös mast – soluja, perineuriaalisoluja ja endoteelisoluja. Neurofibroomat ovat hermon sidekudoksen kasvaimia ja niitä esiintyy tavallisimmin iholla, ihonalaiskudoksessa. Niitä voi esiintyä myös kaikkialla keskushermoston alueella tai sisäelimissä sekä selkäydinkanavassa. Kasvaimien koko ja määrä vaihtelee suuresti. Ihon hyvänlaatuisilla kasvaimilla on taipumus ilmestyä murrosiässä, raskauden ja vaihdevuosien aikana. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää yhteneväistä syytä ihon neurofibroomien syntyyn ja kasvuun. Yhtenäisenä tekijänä ajatellaan olevan hormonimuutokset eri ikäkausissa. (2, 3, 11)



Taudin syntymekanismia koetetaan selvittää muun muassa soluviljelymenetelmin. Koska neurofibroomat sisältävät pääasiassa Schwannin soluja, tutkitaan kasvaimien syntyä viljelemällä niitä. Tässä tutkimuksessa tarkastellaan hormonien vaikutuksia Schwannin soluille estradiolin, testosteronin ja koriongonadotropiini (hCG) avulla. Tutkimuksen alussa tarkastellaan kasvaimien solujen ominaisuuksia yleisellä tasolla. On tärkeää opetella tunnistamaan, mitä soluja kasvain pitää sisällään. Kasvain sisältää muun muassa Schwannin solujen eri genotyyppiä olevat -/- ja +/- solukannat, joi-  
 ta tulisi tarkastella jatkossa hormonitestauksien merkeissä omina näytteinään. Heterotsygoottinen +/- genotyyppi NF1-geenin kromosomissa on tyypillinen NF1-potilaille, kun taas osalle soluista on tapahtunut toisen alleelin katoaminen (LOH, loss of heterozygous) tai somaattinen mutaatio -/-. NF1 Schwannin solujen eri genotyyppiä olevat solukannat merkitään jatkossa -/- ja +/- tavoin. Tavoitteena on saada Schwannin solujen tutkimiseen rutiininomainen menetelmä, mitä voisi myös käyttää tämän tutkimuksen jälkeenkin hyödyksi.

Vaikka ihon hyvänlaatuisten kasvaimien ilmestyminen neurofibromatoosia sairastaville ihmisille ei ole haitallisimmista oireista taudinkuvaa, kasvaimet ovat kuitenkin elämää jonkin verran hankaloittava asia. Ihmisen sukupuolihormonien oletetaan vaikuttavan kasvainten syntyyn ja lisääntymiseen. Tässä työssä oli tarkoitus selvittää onko hormoneilla vaikutuksia Schwannin soluja sisältävän kasvaimen kasvuun valvotuissa soluviljelyoloissa.

Kirjallisuudessa tutustutaan neurofibromatoosiin, selvitetään mistä Schwannin solut saavat alkunsa, kuinka ihon hyvänlaatuinen kasvain syntyy ja tehdään katsaus tutkimuksen kannalta oleellisimpiin hormoneihin. Menetelmäosuudessa kerrotaan kasvainnäytteiden hakemisesta potilailta ja Schwannin solujen viljelemisestä sekä kuvaillaan, kuinka löydettiin menetelmä hormonien tutkimiseen Schwannin soluilla. Tutkimuksen lopussa tulossiossa esitetään protokolla hormonien tutkimiseen Schwannin soluilla sekä Schwannin solujen viljelyn aikana ilmeneviin muihin asioihin, joihin tulisi jatkossa kiinnittää huomiota. Pohdinnassa esitetään ehdotuksia siitä, miten ihon hyvänlaatuisten kasvaimien syntyä voidaan jatkossa tutkia.

Tässä työssä modernin biotekniikan menetelmiä soveltamalla etsitään nimenomaan uusia ratkaisuja, joilla voisi parantaa neurofibromatoosia sairastavien ihmisten elä-

mänlaatua ja hyvinvointia. Ihmisten sairauksien tutkiminen tähtää ihmisten hyvinvointiin. Siten saadaan selville uusia asioita sairauksien syntymekanismeista, ja sitä kautta uutta tietoa lääketieteen avuksi.

## 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Soluviljelytekniikoiden avulla voidaan tutkia soluja ja niiden toimintoja tarkasti kontrolloiduissa olosuhteissa. Solujen viljely tarjoaa mahdollisuuden yksittäisten ja eri solutyyppeiden tutkimiseen olosuhteissa, jossa muiden solujen tai soluväliaineen vaikutukset puuttuvat. Schwannin soluja on viljelty jo kauan. (21) Tutkimuksen tavoitteiden saavuttamista varten oli tarkoitus opetella eristämään neurofibroomista Schwannin soluja ja kehittää mahdollisuuksien mukaan jo olemassa olevaa soluviljelymenetelmää. Tarkoituksena oli syventyä solujen morfologiaan, opetella tunnistamaan Schwannin solujen +/- ja -/- solukannat, ylläpitää solujen kasvatusta, pakastaa saatuja soluja sekä saada ne pakastamisen jälkeen uudelleen kasvamaan.

Soluilla oli tarkoitus testata erilaisia hormoneja, joten työni tarkoituksena oli suunnitella ja kehittää protokolla hormonien testaamiseen Schwannin soluilla. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako neurofibroomien syntyyn ja lisääntymiseen jokin hormonaalinen tekijä murrosiässä, raskauden ja vaihdevuosien aikana. Yhteisenä tekijänä ajatellaan olevan ihmisen lisääntymisfysiologiaa säätelevät gonadotropiinit, jotka kuuluvat sukupuolihormoneihin. Gonadotropiineja ovat follikkelia stimuloiva hormoni (FSH) eli follitropiini, luteinisoiva hormoni (LH) eli lutropiini, jotka erittyvät aivolisäkkeen etulohkosta sekä istukkahormoni eli koriongonadotropiini (hCG), jota muodostuu raskauden aikana sikiöstä ja myöhemmin istukan trofoblastisoluista. LH:n ja hCG:n biologinen aktiviteetti on hyvin lähellä toisiaan. Näiden hormonien alfa- ja beta-alketjut ovat lähes identtiset ja beetaketjuissa on myös huomattavana paljon samaa. Sen takia LH:n vaikutusta Schwannin solujen kasvuun voidaan tutkia suoraan verrannollisesti hCG:n avulla. Tarkoituksena on testata hCG:n lisäksi myös kahden muun sukupuolihormonin, estradiolin ja testosteronin, vaikutusta Schwannin solujen kasvuun. NF1 sairauteen kuuluvat ihon hyvänlaatuiset kasvaimet neurofib-

roomat sisältävät pääasiassa Schwannin soluja, minkä takia neurofibromatoosien syntyä tutkitaan viljelemällä niitä. Soluviljely on perusmenetelmä, jolla voidaan tutkia soluja ja niiden toimintoja sekä sisäisiä rakenteita kontrolloidussa olosuhteissa. Schwannin solujen eristys ja viljely on normaalia soluviljelystä merkittävästi vaativampi menetelmä.

### 3 IHMISEN HERMOSTO

#### 3.1 Keskus- ja ääreishermosto

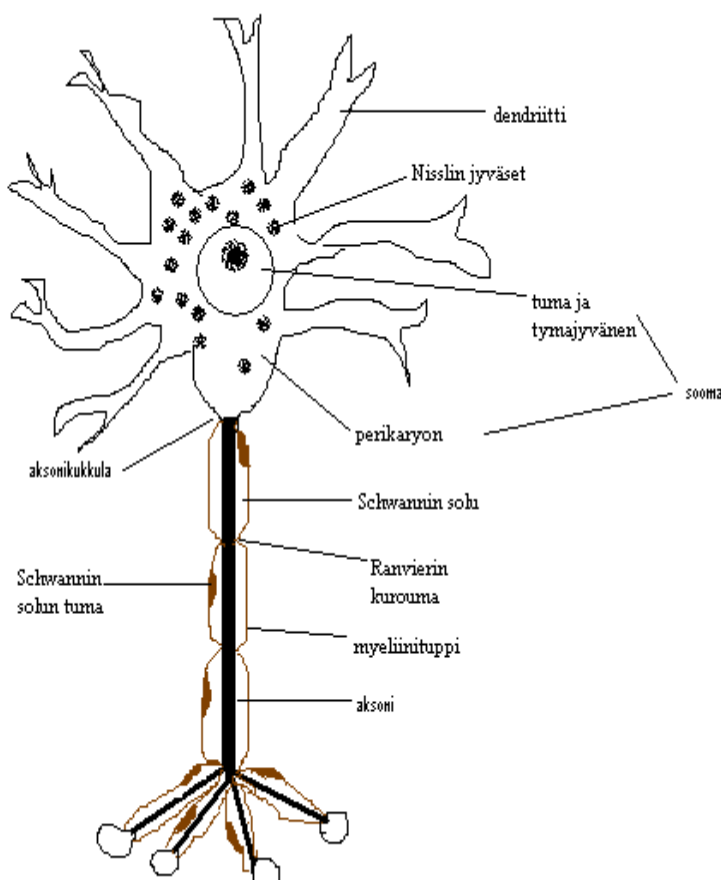
Ihmisen hermosto jaetaan keskushermostoon ja perifeeriseen eli ääreishermostoon. Keskushermostoon kuuluvat aivot ja selkäydin. Ääreishermostoon kuuluvat aivohermot, selkäydinhermot ja autonomisen (tahdosta riippumattoman) hermoston perifeeriset osat. Ääreishermoston hermot ovat muodostuneet hermosolujen jatkeista. Hermosto ottaa vastaan informaatiota aistinreseptoreiden välityksellä. Hermosto kerää tiedon, prosessoi ja tallentaa tietoa sekä lähettää spesifisiä viestejä kohdesoluihin ympäri elimistöä. Yhdessä aistinelinten ja hormonien kanssa hermosto muodostaa elimistöstä yhtenäisesti reagoivan kokonaisuuden, jota ilman elimet toimisivat ristiriitaisesti. Hermosto vaikuttaa muihin elimiin hormonien, välittäjäaineiden ja ylläpitävästi vaikuttavien aineiden välityksellä. (7)

#### 3.2 Hermosolu

Hermosolua kutsutaan myös neuroniksi. (Kuvio 1) Hermosolun tehtävänä on kuljettaa eteenpäin hermoimpulsseja ja olla yhteydessä toisiin soluihin välittäjäaineiden avulla. Hermosolut eivät pääsääntöisesti enää uusiudu erikoistuessaan tai tuhoutuessaan. Tavallinen neuroni sisältää kookkaan tuman. Tumaa ympäröi erityinen solulima-alue, jota kutsutaan myös perikaryoniksi. Tuma ja perikaryon muodostavat yhdessä kulumikkaan muotoisen soomaksi kutsutun alueen. Soomasta ulkonevat useat dendriitit eli tuojahaarakkeet ovat hermoimpulsseja vastaanottavia rakenteita. Dendriitit haarautuvat voimakkaasti kuten puun oksat ja ne ovat yhteydessä tuhansiin aksoneihin. Yhdes-

sä hermosolussa on yleensä yksi aksoni eli viejähaarake. Aksoni alkaa solun soomaosan aksonikukkulasta. Aksoni johtaa impulssin eteenpäin toiseen soluun. Loppuosastaan aksoni jakautuu moniksi haaroiksi ja nämä haarat muodostavat toisten hermosolujen kanssa liittymiä eli synapseja. (7)

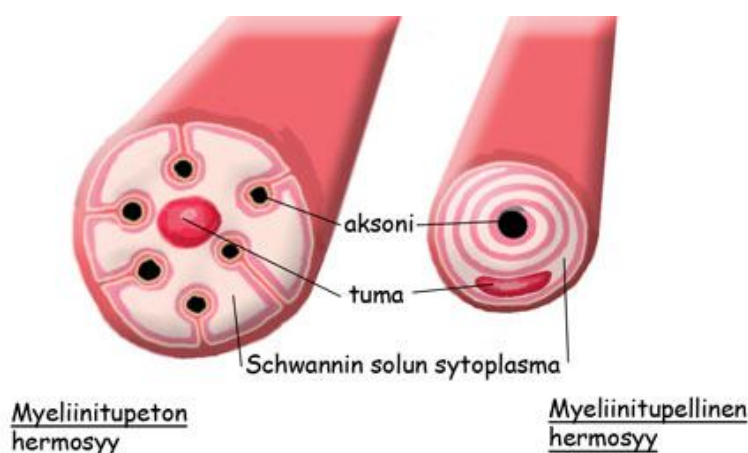
Sekä keskushermoston että ääreishermoston neuronien aksonien ympärillä esiintyy solukalvon erikoistunut rakenne, joka muodostaa niin sanotun eristekerroksen aksonin ympärille. Tämä eristekerros on muodostunut moninkertaisiksi kerrostuneista soluista, jota kutsutaan myeliinitupeksi. Keskushermostossa myeliiniä tuottavat oligodendrosyytit ja ääreishermostossa Schwannin solut. Näitä soluja kutsutaan yhteisnimitykseltään myös gliasoluiksi. Schwannin solu kiertyy aksonin ympärille, jolloin myeliini muodostuu Schwannin solujen rasva-ainepitoisista solukalvoista. Myeliini on erilaista ääreishermostossa ja keskushermostossa. Jotkin taudit, kuten MS-tauti ja eräät aivojen ja selkäytimen tulehdukset vaurioittavat myeliiniä ja aiheuttavat oireita sen hermon vaikutusalueella, jonka myeliinikerros on vaurioitunut. (7)



Kuvio 1. Hermosolu.

### 3.2.1 Myeliinituppi

Keskityn opinnäytetyössäni Schwannin solujen tarkasteluun. Kukin Schwannin solu muodostaa 0,3 – 1,5 mm pitkän pätkän myeliinituppea. Kuva myeliinitupellisesta hermosyystä on kuvassa 2. Vierekkäisten pätkien välissä on myeliinitupessa katkos, jota kutsutaan Ranvierin kuroumaksi. Kaikki aksonit eivät ole myeliinitupen peitossa. Myelinisoitumattomassa ääreishermoston hermosyössä yksi Schwannin solu ympäröi useaa aksonia. Schwannin solun tuma on yleensä näiden keskellä. Myelinisoitumattomassa hermosyössä ei ole Ranvierin kuroumia, vaan solut ovat tiiviisti toisiinsa liittyneitä. Ranvierin kurouman kohdalla aksonin solukalvo ei ole päällystetty, joten ionipumput voivat pumpata ioneja solun sisään ja solusta ulos. Näin ionipumput ylläpitävät solukalvon kalvojännitettä Ranvierin kuroumassa ja vievät hermoimpulsseja eteenpäin. Myeliinitupen kohdalla ei tapahdu ionien vaihtoa solun ja sen ympäristön kesken eli myeliinituppi toimii myös eristeenä. Myelinisoituneessa aksonissa hermoimpulssit kulkevat nopeammin kuin myelinisoitumattomassa. Myelinisoitumattomia hermosyitä on sekä keskushermostossa että perifeerisessä hermostossa. Keskushermostossa myelinisoitumattomat hermosyyt kulkevat irrallaan hermo- ja tukisolujen haarojen välissä. Kuva erilaisista myeliinitupista kuviossa 2.(7)



Kuvio 2. Myeliinituppi.

### 3.2.2 Synapsi

Kahden hermosolun välistä liittymäkohtaa kutsutaan synapsiksi. Hermoimpulssi siirtyy tai jää siirtymättä sen kautta neuronista toiseen. Aksoni haaroittuu päästään pieneksi laajenemaksi ja sitä kutsutaan synapsipäätteeksi. Synapsipäätteitä on useita ja ne muodostavat synapsin neuronien dendriittien kanssa. Kun ääreishermostosta lähtee käsky, tieto välittyy neuronien välityksellä kohdesoluille. Peräkkäisten neuronien määrä riippuu kohteesta. Kun käsky välittyy aksonia pitkin synapsipäätteeseen, vapautuu aksonin synapsipäätteestä synapsirakoon välittäjäaineita, joita on varastoitu valmiiksi välittäjäainerakkuloihin. Synapsirako on synapsipäätteen ja seuraavan neuronin dendriitin välissä. Siitä onko tarkoituksena stimuloida vai inhiboida, riippuu siitä, mitä välittäjäainetta vapautuu synapsirakoon. Vastaanottavan neuronin dendriittien reseptorit tunnistavat välittäjäaineet, jotka sitoutuvat reseptoreihin. Jos välittäjäaine ja reseptorit ovat toista tyyppiä, voi seurauksena olla käskyn inhiboiminen. Vastaanottava reseptori välittää puolestaan tiedon edelleen solun sisään. Sen seurauksena ionikanavien toiminta muuttuu siten, että solukalvon lepopotentiaali muuttuu. Solukalvon sisäpuolella on negatiivinen varaus, mutta silloin kun synapsi on kiihottava eli eksitoiva niin tapahtuu depolarisaatio. Silloin kalvojännite on hetken aikaa positiivinen ja vastaanottavassa neuronissa syntyy aktiopotentiaali, joka ajaa tietoa edelleen eteenpäin. (7)

## 4 NEUROFIBROMATOOSI NF1

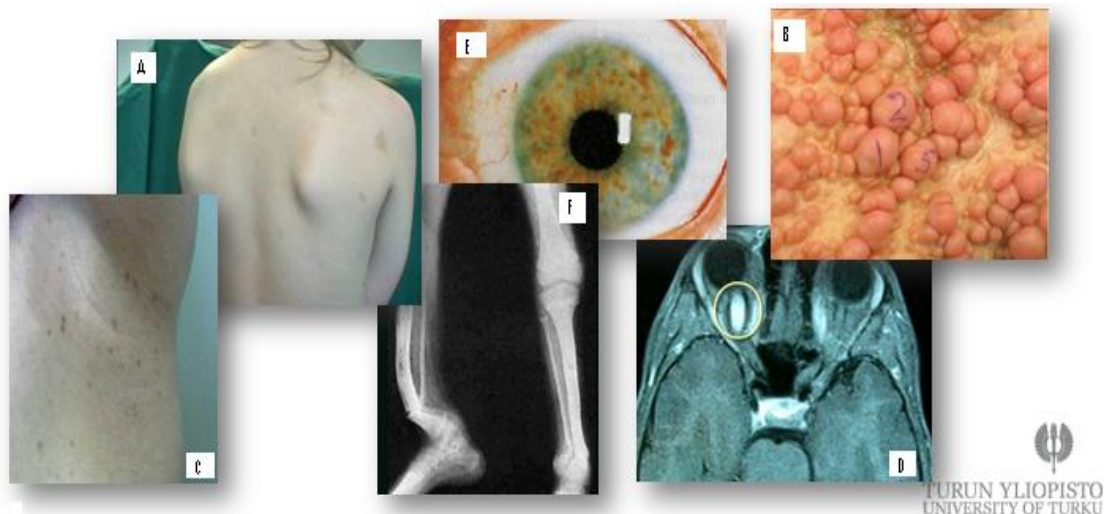
### 4.1 Taudinkuva

Neurofibromatoosin taudinkuva voi olla eri yksilöillä hyvinkin erilainen. Taudin vaikeusaste vaihtelee huomattavasti henkilöstä toiseen samankin perheen sisällä. Noin 10–20%:lla sairastuneista taudinkuva on hyvinkin vaikea hankaline kasvaimineen. Joillakin voi ilmetä ihossa niin kutsuttuja maitokahviläiskä, kun taas toisella saattaa olla neurofibromatoosin aiheuttamia epämuodostumia kasvoissa. Neurofibromatoosi määritellään eteneväksi sairaudeksi, sillä tietyt muutokset ilmaantuvat tiettyyn ikään mennessä ja jotkut oireet pahenevat iän myötä. Taudinkulun ennustaminen yksittäisen

potilaan kohdalla on vaikeaa ja sen takia NF1- potilaat käyvät harvakseltaan NF1- tautiin perehtyneen lääkärin seurannassa. (2, 3, 11)

NF1 – diagnoosi perustuu National Institute of Health:n (NIH, USA) vuonna 1987 hyväksymiin kriteereihin. Kriteerien mukaan potilaalla pitäisi olla ainakin kaksi seuraavista ominaisuuksista (10)

- $\geq 6$  ihon café-au-lait – läiskää, jotka ovat ennen puberteettia yli 5 mm ja puberteetin jälkeen yli 15 mm (Kuva 1, A)
- $\geq 2$  neurofibroomaa tai yksi pleksiforminen neurofibrooma (Kuva 1, B)
- kesakoita nivus- tai kainaloalueella (Kuva 1, C)
- näköhermon kasvain (Kuva 1, D)
- $\geq 2$  Lischin nodulusta eli silmän värikalvolla olevat kyhmyt (näkyvät ruskeina täplinä iriksessä) (Kuva 1, E)
- luuston alueen kehityshäiriöt kuten luiden synnynnäinen taipuminen, pseudoartroosi ja skolioosi (Kuva 1, F)
- lähisukulaisella oleva NF1



Kuva 1. Tyypin NF1 taudinkuvaan liittyvät oireet kuvina.

#### 4.1.1 Cafe-au-lait – läiskät

Maitokahviläiskien ilmaantuminen on yleensä ensimmäinen merkki NF1- potilaalla. Läiskät näkyvät usein vastasyntyneessä ja lisääntyvät muutaman ensimmäisen elinvuoden kuluessa. Näitä muutoksia on lähes jokaisella neurofibromatoosia sairastavalla. Maitokahviläiskät ovat soikeita, epäsymmetrisiä ja tarkkarajaisia vaaleanruskeita läiskä. Näihin läskiin ei liity pahanlaatuistumisen riskiä. Läiskien koko vaihtelee kesäkon kokoisesta jopa toisen puolen vartalosta peittävään läiskään. (3, 10, 11)

#### 4.1.2 Muut komplikaatiot

Neurofibromatoosiin liittyy useita erilaisia oireita, joita esiintyy vain osalla potilaista. Jo vauvaikäisellä saattaa olla epämuodostumia kasvoissa. Lapsuusiässä luiden kasvu voi olla epäsymmetristä, voi esiintyä myös luukatoa tai valenivelen muodostumista. NF1- henkilöt ovat myös keskivertoa lyhyempiä. NF1- potilailla saattaa esiintyä myös skolioosia, kuuroutta, silmän iiriksessä olevia ruskeita täpliä (Lischin noduluksia), näön häiriöitä, kouristuksia, kohonnut verenpaine, hermostollisia puutosoireita ja syöpätauteja. Hienomotoriikan häiriöt, oppimisvaikeudet ja ylivilkkaus saattavat kuulua myös NF1- taudin kuvaan. NF1- potilaat ovat älykkyydeltään keskivertoa alhaisempia. Sairaudesta aiheuttaa lukuisten oireidensa takia potilaille huonon itsetunnon, epäsosiaalisuutta ja sairastuneiden sosiaaliset taidot ovat usein heikkoja. (2,3,4)

#### 4.2 Neurofibroomat

Neurofibroomat ovat tyypin 1 neurofibromatoosin yksi keskeisimpiä tunnusmerkkejä. Neurofibroomat ovat hyvänlaatuisia hermon tukikudoksen kasvaimia, jotka koostuvat pääasiassa Schwannin soluista ja fibroblasteista. Neurofibroomat sisältävät myös mast-soluja, perineuraalisoluja ja endoteelisoluja sekä runsaasti kollageenia sisältävää soluväliainetta. Neurofibroomat ovat hermoa ympäröivän sidekudoksen kasvaimia ja niitä esiintyy tavallisimmin iholla, ihonalaiskudoksessa. Niitä voi esiintyä myös kaikkialla keskushermoston alueella tai sisäelimissä sekä selkäydinkanavassa. Kasvaimien koko ja määrä vaihtelee suuresti erityisesti hormonaalisten muutosten yhteydessä, kuten murrosiässä, raskauden ja vaihdevuosien aikana. (1,2)



Neurofibroomat jaotellaan neljään eri ryhmään. Kutaaninen neurofibrooma on kiinteästi ihoon liittyvä hyvänlaatuinen kasvain, joka on saanut alkunsa pienistä ihon hermopäätteistä. Tämä kasvain kehittyy 99 %:lla potilasta. Kyseessä on punertava, kutiava, antihistamiineille reagoimaton, ihon mukana liikkuva ja esteettistä haittaa aiheuttava kasvain. Kasvaimien määrä ja koko vaihtelee potilaskohtaisesti alle kymmenestä tuhansiin kasvaimiin, ja se ei ole mitenkään ennustettavissa. Kasvaimet aiheuttavat potilaille usein psyykkisiä ongelmia esteettisen haittansa takia. Nämä kasvaimet voidaan poistaa laserilla leikkaamalla, mutta poistetun kasvaimen tilalle saattaa ilmestyä uusi kasvain. (1,2,3) Nämä ihon neurofibroomat ovat oleellisia opinnäytetyöni tutkimuksen kannalta.

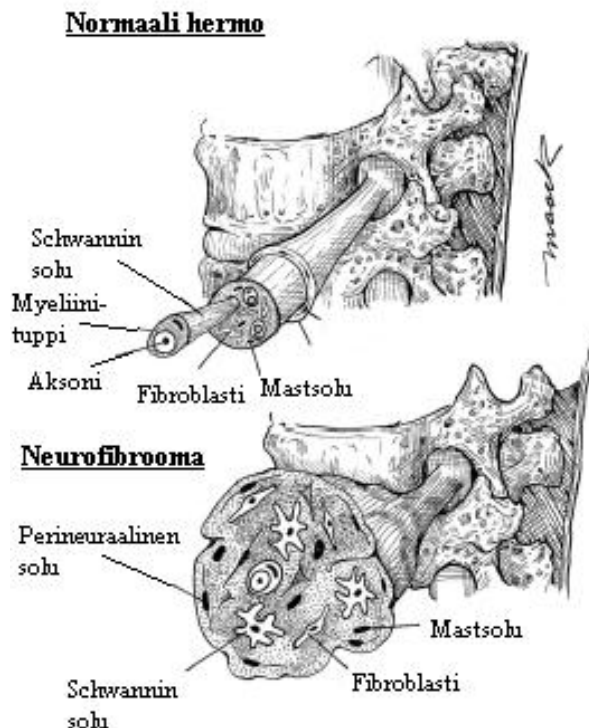
Subkutaaninen neurofibrooma saa myös alkunsa pienistä hermopäätteistä, mutta se sijaitsee syvemmällä. Nämä neurofibroomat voivat aiheuttaa kipua ja hermostollisia oireita. Ne eivät myöskään liiku ihon mukana. Pleksiforminen neurofibrooma saa alkunsa isoista hermojuurista ja kasvaa useimmiten ihonalaisissa kudoksissa sekä ihoon kiinnittyneenä. Se voi kasvaa jopa useiden kilojen painoiseksi kasvaimeksi ja se saattaa muuttua myös pahanlaatuiseksi neurofibrosarkoomaksi. Pleksiformista neurofibromatoosia tavataan 60 prosentilla NF1 potilaista. Kasvaimet ilmestyvät usein lapsuudessa tai murrosiässä. Ne ovat esteettisesti haitallisia sekä voivat aiheuttaa hermostollisia ongelmia. Pleksiformisia kasvaimia on erittäin hankala poistaa, koska ne saattavat ulottua syvälle pitkin hermorunkoa, kasvaa suurien verisuonten ympärille tai yltää selkäytimeen asti. Tutkimusten mukaan alle 50-vuotiailla neurofibromatoosia sairastavilla naisilla on lisääntynyt riski sairastua rintasyöpään johtuen kasvaimista, jotka saattavat muuttua pahanlaatuiseksi. (1,2,3)

#### 4.2.1 Neurofibroomien muodostuminen

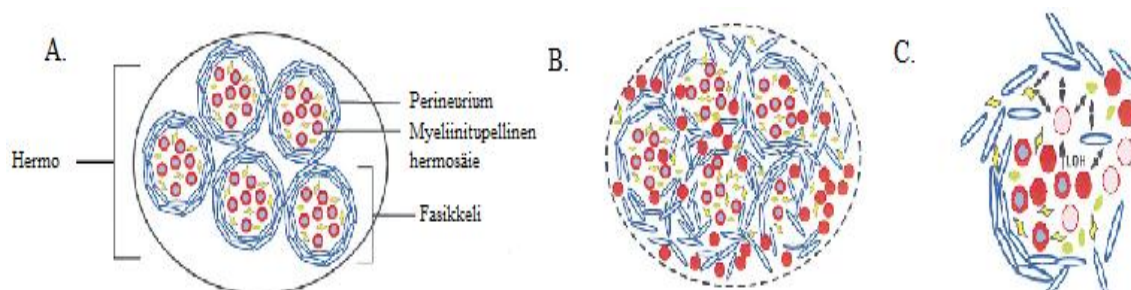
Neurofibroomakasvaimen heterogeenisyys eri solutyypin suhteen asettaa haasteen kasvaimen synnyn ja kehityksen ymmärtämiselle. Kasvaimen solutyypin luontainen keskinäinen riippuvuus on perustana neurofibroomien monimutkaisuudelle. Neurofibrooma sisältää samat solut kuin normaali hermo. Normaalissa hermossa neurofibroomien oletetaan saaneen alkunsa niin sanotusta toisesta osumasta geenissä. NF1-geeniä

kutsutaankin Knudsonin kaksoisosumateoriaan nojaten tuumorisuppressiogeneiksi. Knudsonin kaksoisosumateoria perustuu siihen, että geenien molempien alleelien tulee inaktivoitua ennen kuin geenistä aiheutuvan sairauden oireet ilmentyvät. Osassa kasvainten Schwannin soluista on havaittu olevan NF1-potilaille tyypillinen heterotsygoottinen +/- genotyyppi NF1-geenin kromosomissa, kun taas osalle soluista on tapahtunut toisen alleelin katoaminen (LOH) tai somaattinen mutaatio -/-. (16)

Schwannin solut jakautuvat vilkkaasti hermon kehityksen aikana ja solut ohjaavat aksonien kasvua muun muassa tuottamiensa erilaisten tyvikalvon proteiinien avulla. Schwannin solujen kasvu lisääntyy hermon katkeamisen yhteydessä, jolloin hermon sidekudoksen solut alkavat jakautua, vaeltaa vahingoittuneiden solujen tilalle ja ohjata paranevien aksonien kasvua. Neurofibromatoosissa hermon sidekudoksesta alkunsa saavat kasvaimet syntyvät useamman solutyypin kontrolloimattomasta kasvusta (21). Neurofibroomien on huomattu lisääntyvän paikallisen vamman tai hormonaalisten muutosten seurauksena. Vammojen syntyminen aiheuttaa elimistössä joko haavan paranemis- tai hermojen uusiutumisprosessin ja sen oletetaan laukaisevan ja lisäävän neurofibromatoosin muodostumista. Erityisesti hormonaalisten muutosten oletetaan olevan yhteydessä neurofibroomien muodostukseen. Neurofibroomilla on taipumus ilmestyä murrosiässä, jolloin ne yleensä ensimmäisen kerran havaitaan. Toinen merkittävä ajanjakso neurofibroomien ilmentymiselle on raskaus. (16) Jo olemassa olevien neurofibroomien koko suurenee jopa 50 prosenttia ja uusien kasvaimien määrä saattaa lisääntyä jopa 60 prosenttia raskauden aikana. (25) On merkittävää, että neurofibroomien koko pienenee synnytyksen jälkeen. Syitä edellä mainittuihin huomioihin ei vielä tiedetä. (16) Neurofibroomien muodostumista on havainnollistettu kuvioissa 3 ja 4.



Kuvio 3. Normaali hermo vs. neurofibrooma hermo. Kuvassa havaittavissa normaalin hermon ero neurofibrooma hermoon. Neurofibroomassa solujen määrä lisääntyy ja normaalin hermon rakenne rikkoutuu. (muunneltu 15)

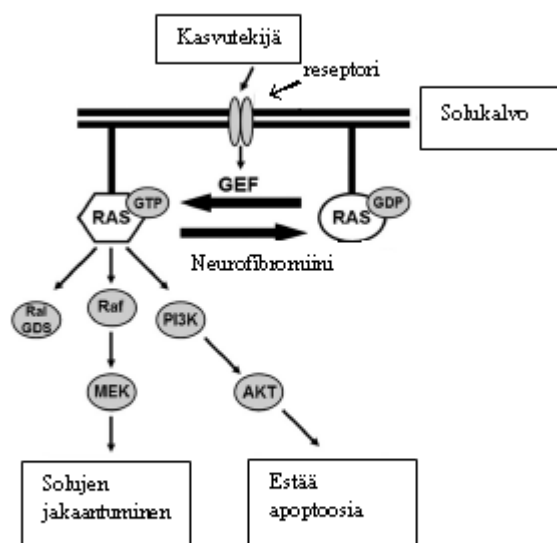


Kuvio 4. Neurofibrooman kehittyminen. A. Ääreishermosto koostuu useista solutyypeistä; hermosoluista (sininen), Schwannin soluista (punainen), perineuriaalisoluista (harmaa), fibroblasteista (keltainen) ja satunnaisesti myös mast-soluista (vihreä). B. Neurofibrooman kehittyessä solujen määrä lisääntyy, Schwannin solut irtoavat aksoneista ja perineurium hajoaa. C. Neurofibrooman kehityksen oletetaan saavan alkunsa terveen NF1- alleelin mutaatioitumisesta tai katoamisesta (-/-, vaaleanpunainen) Schwannin soluissa. (muunneltu 16)

### 4.3 NF1 geeni ja proteiini

Neurofibromatoosia (NF1) kutsutaan myös nimellä von Recklinghausenin tauti. Saira-  
raus on tunnettu jo vuosisatoja, mutta vasta 1982 saksalainen von Recklinghausen  
esitti perusteellisen kuvauksen neurofibromatoosista. Recklinghausen paikallisti neu-  
rofibromatoosin aiheuttaman geneettisen häiriön kromosomiin 17 (3). Kyseessä on  
suuri geeni, mikä käsittää 60 eksonia sekä 350kb genomista DNA:ta. Tyypin 1 neuro-  
fibromatoosin aiheuttaa mutaatio NF1- geenissä. NF1- geeni sisältää rakennusohjeet  
proteiinille nimeltä neurofibromiini, mikä sisältää 2818 aminohappoa. Tämä proteiini  
on mukana solujen kasvun kontrolloinnissa ja sitä tavataan runsaasti neuroneissa, oli-  
godendrosyyteissä ja Schwannin soluissa. Sitä esiintyy myös vaihtelevasti muissa so-  
lutyypeissä aikuisilla, kuten keratinosyyteissä ja valkosoluissa. NF1- geenin lähetti-  
RNA on 11–13 kb emäsparin kokoinen. Se esiintyy lähes kaikissa kudoksissa, erityi-  
sesti aivoissa, selkäytimessä ja ääreishermostossa. (13, 15)

Neurofibromiini- proteiini on sukua GTPaasia (guanosiinitrifosfaatti) aktivoivalle pro-  
teiinille (GAP), jonka on osoitettu toimivan Ras-syöpägeenin vastavaikuttajana. GAP  
on neurofibromiinin parhaiten tunnettu toiminnallinen osa, joka on sukua neurofibro-  
miinin domeenille (GRD). Neurofibromiinin GRD stimuloi luontaista GTPaasin p21-  
RAS-GTP:tä hydrolysoidakseen GTP:n GDP:ksi. Neurofibromiinin pääasiallisena teh-  
tävänä on inaktivoida aktiivinen Ras-GTP inaktivoiden p21-RAS. Ras- proteiini sääte-  
lee solua välittämällä signaaleja solukalvolta tumaan. Ras-proteiini on kiinni solukal-  
volla farnesyylitransferaasin avulla. Ras on osa signaalinvälitystietä, jota aktivoivat  
kasvutekijät ja niiden reseptorit, kuten epidermaalinen kasvutekijä (epidermal growth  
factor, EGF), hermokasvutekijä ja verihiutalekasvutekijä (platelet-derived growth fac-  
tor, PDGF). Kasvanut Ras-GTP pitoisuus johtaa raf kinaasin kautta MEK-kinaasin  
aktivaatioon ja mitogeneia aktivoivan proteiinikinaasin (MAP) isoformien Erk1 ja  
Erk2 aiheuttaen edelleen solujen jakaantumisen. Kasvanut Ras-GTP suojaa soluja  
myös apoptoosilta eli solukuolemalta aktivoimalla proteiinikinaasin B/Akt:n P13- ki-  
naasin avulla tai aktivoimalla tumatekijä  $\kappa$ B:n (NF- $\kappa$ B). Ras on avaintekijä monien  
kasvutekijöiden signaalin välityksessä ja neurofibromiinin puute lisää solujen jakau-  
tumista ja selviytymistä. (3, 13, 15) Neurofibromiinin tehtävää on havainnollistettu  
kuviossa 5.



Kuvio 5. Neurofibromiinin tehtävä Ras:n aktivaatiossa ja signaloinnissa. (muunneltu, 15)

#### 4.4 NF1 mutaatiot

Kaikissa NF1 potilaan soluissa NF1 – alleeli kantaa geneettistä variaatiota. Neurofibrooman kehitys saa tutkimusten mukaan alkunsa niin sanotusta toisesta osumasta NF1- geenissä. Sen perusteella NF1- geeniä kutsutaankin Knudsonin kaksoisosuma-teoriaan nojaten tuumorisuppressiogeneiksi. Toisen NF1 – alleelin puuttuminen somaattisista soluista aiheuttaa toiminnallisen neurofibromiinin puutetta. Tutkimukset ovat osoittaneet, että osassa kasvaimen Schwannin soluista on heterotsygoottinen genotyyppi (+/-, loss of heterozygosity, LOH) tai molempien NF1 – alleelien poistuminen (-/-), mitkä liittyvät kutaanisten ja pleksiformisten neurofibroomien muodostukseen sekä pahanlaatuisten ääreishermoston kasvainten muodostukseen neurofibroma-toosiin sairastuneilla. LOH ilmenee vain kromosomissa, joiden ituradassa ei esiinny mutatoitunutta alleelia. Deleetioiden koko vaihtelee tai deleetiot voivat olla tietyissä kohdissa NF1- geeniä. Useat eri tutkimukset ovat osoittaneet, että LOH tai pistemutaatioiden osuus NF1- geenissä on neurofibroomissa huomattava. (13, 14)

Pistemutaatiot ovat yleisiä NF1- geenissä ja vaikuttavat siten myös geenin silmukoitumiseen. Niistä aiheutuu edelleen somaattisia ja ituradan mutaatioita. Monien NF1-

potilaiden mutaatioiden on todettu aiheuttavan proteiinituotteiden lyhentymistä, mikä seurauksena muodostuu toimimaton proteiini ja aktiivisen neurofibromiinin pitoisuus vähenee. Pienet geenin sisäiset poistot ja lisäykset aiheuttavat kolmanneksen kaikista mutaatioista. Vain seitsemän prosenttia 300 raportoidusta mutaatiosta on havaittu uudestaan. Mutaatioiden syntyyn voi vaikuttaa moni eri asia, kuten ajoitus, ympäristö, toisen osuman sijainti geenissä tai tuntemattomien geenien muutokset, jotka vaikuttavat sairauden ilmentymiseen. Neurofibromatoosi voi siis syntyä useiden eri mutaatioiden seurauksena, mikä selittää puolestaan sairauden oireyhtymän suuren kliinisen vaihtelun. (15)

#### 4.5 Perinnöllisyys

Neurofibromatoosi on yksi yleisimmistä autosomaalisesti dominantisti periytyvistä sairauksista. Sairaalan perintötekijän läpäisevyys on siis täydellinen, mikä tarkoittaa sitä, että tauti ilmenee kaikilla muuttuneen geenin kantajilla eli sairaus ei voi olla piilevänä. Sairauden ilmaantuvuus ympäri maailmaa on 1/3000 ja sille on ominaista suurentunut riski erilaisiin syöpäsairauksiin (1, 14). Suomessa arvioidaan olevan 1000–2000 neurofibromatoosia sairastavaa ihmistä. Taudin esiintyvyydessä ei ole eroa maantieteellisten tai etnisten ryhmien välillä. Taudista ei voi parantua. Se määritellään eteneväksi sairaudeksi, sillä tietyt muutokset ilmaantuvat tiettyyn ikään mennessä ja jotkut oireet pahenevat iän myötä. Taudin ilmeneminen voi olla hyvinkin erilaista jopa saman perheen neurofibromatoosia sairastavien yksilöiden kesken. NF1 geenin mutaatiovauhti on hyvin suuri, jolloin terveet vanhemmat voivat saada NF1-mutaatiota sairastavan jälkeläisen. Noin puolet kaikista tapauksista aiheutuu uusista mutaatioista. (3, 11, 12)

## 5 HORMONIT

### 5.1 Hormonien rakenne

Hormonit ovat biomolekyyliä, jotka vaikuttavat jo pieninä pitoisuuksina muiden solujen toimintaan ja joita erikoistuneet solut erittävät verenkiertoon. Hormoni leviää verenkierron mukana koko elimistöön, mutta se vaikuttaa kuitenkin vain tiettyihin soluihin, joita kutsutaan hormonin kohdesoluiksi. Kohdesolut muodostavat yhdessä kohde-elimen. Hormoneja erittävistä soluista on muodostunut erityisiä umpirauhasia eli endokriinisia rauhasia. Monissa elimissä on myös muiden solujen lomassa hormoneja erittäviä soluja. (7)

Hormonit poikkeavat kemialliselta rakenteeltaan paljon toisistaan. Vesiliukoiset hormonit ovat joko aminohappojohdannaisia tai aminohapoista koostuvia peptidiketjuja tai proteiineja sekä niihin saattaa olla liittyneenä hiilihydraattiosa. Rasvaliukoiset hormonit ovat yleensä steroideja. (7)

### 5.2 Hormonien vaikutustavat

Hormonit ja muut viestiaineet vaikuttavat kohdesoluihinsa sitoutumalla niiden solukalvossa oleviin reseptoreihin eli vastaanottimiin, jotka välittävät vaikutuksen edelleen soluun. Eräät rasvaliukoiset hormonit eivät pysähdy solukalvoon vaan menevät solun sisään. Esimerkiksi steroidihormonien ja D-vitamiinin reseptori on vasta tumassa. Hormonin ja reseptorin yhteenliittymä vaikuttaa tumaan siten, että tiettyjen lähetti-RNA-molekyylien ja niiden vaikutuksesta juuri kyseessä olevalle hormonille ominaisten proteiinien tuotanto lisääntyy. Proteiini- ja peptidihormonit vaikuttavat viestiaineiden yleiseen tapaan solukalvon reseptoreihin. Kullekin hormonille on olemassa vain sille ominaiset reseptorit, joita on useita eri tyyppejä. (7)

Solukalvon reseptoriin liittynyt hormoni ei vaikuta siis suoraan tumaan. Muutamit hormonit avaavat tai sulkevat ionikanavia, toiset vaikuttavat reseptoriin liittyneen G-proteiinin kautta ja kolmannet vaikuttavat jonkun entsyymin välityksellä. (7)

### 5.3 Gonadotropiinit

Ihmisen lisääntymisfysiologiaa säätelevät kolme eri gonatropiinia, joita ovat follikkeliä stimuloiva hormoni (FSH) eli follitropiini, luteinisoiva hormoni (LH) eli lutropiini, mitkä erittyvät aivolisäkkeen etulohkosta sekä istukkahormoni (hCG), jota muodostuu raskauden aikana sikiöstä ja myöhemmin istukan trofoblastisoluista. Gonadotropiinit ovat rakenteeltaan glykoproteiineja ja ne koostuvat kahdesta alfa- ja beeta-ketjusta sekä kullekin hormonille ominaisista hiilihydraattiketjuista. Edellä mainituilla gonatropiineilla alfa-ketjut ja siihen liittyneet rakenneosat ovat samanlaisia. Rakenteelliset erot koostuvat beetaketjun aminohapoista, hiilihydraattiketjujen erilaisesta määrästä ja eroista niiden sitoutumiskohdista beetaketjuun. Ilman hiilihydraattiosaa gonadotropiinit menettäisivät biologisen aktiivisuutensa. Mitä enemmän hiilihydraattirakenneosassa on siaalihappoja, sitä pidempi on niiden puoliintumisaika. Hiilihydraattiketjujen tehtävä on pidentää gonadotropiinien puoliintumisaikaa ja voimistaa niiden biologista aktiivisuutta reseptoriin sitoutumisen yhteydessä. Samankin gonadotropiinin hiilihydraattikoostumus voi vaihdella eri molekyyleissä ja muuttaa hormonin aktiivisuutta eri fysiologisissa ja patofysiologisissa tiloissa. (5)

#### 5.3.1 Gonadotropiinien erityksen säätely

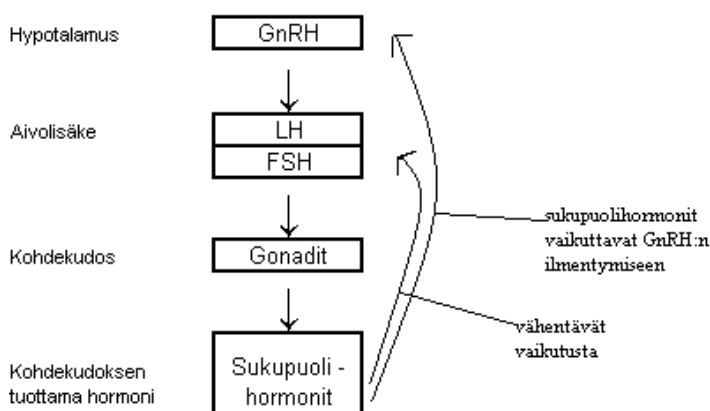
Ihmisen aivolisäkkeessä on kaksi täysin erillistä rauhasta, joita ovat etulohko ja takalohko. Aivolisäke muodostaa yhdessä hypotalamuksen kanssa monimutkaisen hormonaalisen säätelyjärjestelmän. Hypotalamuksen tehtävänä on säädellä aivolisäkkeen toimintaa. Aivolisäke on pieni ja hyvin keskeinen umpirauhanen, minkä tehtävänä on erittää erilaisia hormoneja. Monet aivolisäkkeen erittämät hormonit säätelevät puolestaan muiden umpirauhasten toimintaa. (5)

Hypotalamus ohjaa sekä miehen että naisen sukupuolielinten kehitystä ja toimintaa. Joidenkin tähän säätelyyn osallistuvien hypotalamussolujen toiminta on sikiökauden alussa rytmistä. Poikasikiöltä tämä rytmisyys häviää todennäköisesti kivesten erittämisen testosteronin vaikutuksesta. Tytöille rytmisyys jää pysyväksi, mikä ilmenee myöhemmin kuukautiskiertonä. Hypotalamus säätelee sukupuolitoimintoja erittämällä hypofyyisin porttilaskimojärjestelmään gonadoliberiiniä eli gonadotropiineja vapautta-



vaa hormonia (GnRH). Tämä puolestaan lisää aivolisäkkeen kummankin gonadotropiinin, sekä follitropiinin (FSH) että lutropiinin (LH), eritystä. GnRH erittyy hypotalamuksesta sysäyksittäin.(7)

Gonadotropiinit, kuten lutropiini ja follitropiini ovat lähtöisin aivolisäkkeen etulohkosta. Suurin osa gonadotrooppisoluista tuottaa sekä lutropiinia että follitropiinia. Naisilla progesteroni ja estrogeenit sekä miehillä testosteroni ja pienet estradiolipitoisuudet vähentävät negatiivisen palautteen kautta gonadotropiinin eritystä. Myös veressä kiertävät sukupuolihormonit vaikuttavat suoraan hypotalamukseen ja sitä kautta GnRH:n eritykseen. GnRH on kymmenen aminohapon muodostama peptidihormoni, joka syntyy hypotalamuksen GnRH- neuroneissa. LH:n ja FSH:n erityks on riippuvainen hypotalamuksesta erittyvästä gonadotropiineja vapauttavasta hormonista GnRH:sta. GnRH vapautuu GnRH- neuroneista neurosekreettinä eminentia medialisin kautta aivolisäkkeen varren porttilaskimojärjestelmään, joka edelleen kuljettaa hormonin kohdepaikkaansa aivolisäkkeen etulohkoon. Kuten jo aiemmin tekstissä mainittiin, GnRH:n erityks on pulsseittaista, mikä on välttämätöntä gonadotropiinien erityksen stimulaation kannalta. Pulsseittaisen erityksen vasteena LH:ta erittyy pulssina miehillä 1,5-3 tunnin ajan ja naisilla 1-5 tunnin välein. GnRH- pulssien värähdyslaajuus ja pulssien esiintymisen lukumäärä määräävät sen, erittyykö pulssista LH:ta vai FSH:ta, ja kuinka voimakkaasti. Jatkuva GnRH-stimulaatio saa aikaan puolestaan gonadotropiinien erityksen vaimentamisen. (5) Gonadotropiinien säätely on kuvattu kuviossa 6.



Kuvio 6. Gonadotropiinien säätely. (muunneltu 5)

### 5.3.2 Follitropiini (FSH) ja luteinisoiva hormoni eli lutropiini (LH)

FSH:n tehtävänä on edistää kuukautiskierron alussa munasolun ja munarakkulan kasvua sekä lisätä munarakkulan tekemää hormonien eritystä. FSH ohjaa myös siittiöiden tuotantoa kiveksissä. FSH sitoutuu granuloosasoluihin ja lisää niiden aromataasiaktiivisuutta, jolloin estronin erityis lisääntyy. FSH vaikuttaa myös granuloosasolujen jakaantumiseen ja siten munarakkulan kasvuun, munarakkulan myöhäiskehitykseen, aiheuttaa ovulaation ja ohjaa sitten keltarauhasen kehittymistä ja hormonituotantoa. Aivolisäkkeen etulohkosta verenkiertoon erittyvän LH-hormonin tehtävä on stimuloida munasolujen irtoamista tarttumalla kohdesolujen reseptoreihin. Nämä reseptorit kuuluvat G-proteiinikytkentäisiin eli solukalvon läpäiseviin reseptoreihin. Kun LH- ja FSH-hormonit sitoutuvat reseptorin ekstrasellulaariosaan, ne saavat aikaan syklisen adenosiinimonofosfaatin pitoisuuden lisääntymisen ja solun metabolisen aktiivisuuden lisääntymisen. (6)

Lutropiinin ja follitropiinin pitoisuudet ja tehtävät vaihtelevat naisten kuukautiskierron eri vaiheessa. LH osallistuu munarakkulan myöhäiskehitykseen, aiheuttaa ovulaation ja ohjaa sitten keltarauhasen kehittymistä ja hormonituotantoa sekä stimuloi miehen kivesten Leydigin solujen androgeenituotantoa. Sen takia LH:ta kutsutaan myös kiveksoluja eli interstiaalisoluja stimuloivaksi hormoniksi. Veressä kiertävät estrogeenit ja progesteroni pitävät negatiivisen palautteen kautta seerumin LH pitoisuudet lähes koko kuukautiskierron ajan pieninä. Follilukaaarisen vaiheen lopussa estradiolipitoisuuden suurenemista seuraava lasku vapauttaa positiivisen palautteen kautta suuren määrän LH:ta aivolisäkkeestä ja sitä seuraa munasolun irtoaminen. Progesteroni sammuttaa tämän palautteen. (6,7)

Kuukautisvuodot loppuvat keskimäärin 50 vuoden iässä. Aluksi ne muuttuvat epä säännöllisiksi ja lopulta ne jäävät kokonaan pois. Kuukautisten loppumista kutsutaan menopaussiksi. Muutaman vuoden aikaa ennen ja jälkeen menopaussia kutsutaan vaihdevuosiksi. Vaihdevuosien syynä on munasarjojen follikkeleiden käyminen vähiin, koska ne ovat joko surkastuneet tai ovuloituneet. Sen seurauksena estrogeenin erityis vähenee ja kohdun limakalvo ei enää kasva niin paksuksi, että voisi tulla kuukautisvuoto. Hypotalamus vapautuu palaute-estostaan ja stimuloi aivolisäketä erittämään yhä enemmän gonadotropiineja. (7) Inhibiinit ovat munarakkuloiden granuloosasolu-

jen tuottamia glykoproteiinihormoneja. Vaihdevuosien aikana naisella inhibiini-B:n määrä verenkierrassa pienenee ja sen jarruvaikutus aivolisäkkeessä vähenee. Naisella inhibiini A:n erityis seuraava progesteronin erityistä ja inhibiini B erittyy kasvavasta follikkelista heijastaen samalla FSH-pitoisuutta. Sen seurauksena FSH:n pitoisuus alkaa vähitellen suuren. Kun aikaisempaa suurempi määrä FSH:ta vaikuttaa munasarjoihin, munarakkulojen estrogeenituotanto pysyy ennallaan tai voi lisääntyä. Vähitellen estradiolin aikaansaama positiivinen palaute aiheuttaa sen, että ovulaatiota ei enää tapahdu. Menopausia lähestyttäessä hypotalamus-aivolisäke järjestelmään tulee niin sanottu häiriöitä, jolloin estradiolin määrä taas pienenee. Gonadotropiinien että estradiolipitoisuuksien suuret vaihtelut ovat tällöin tyypillisiä. (5,6)

FSH vaikuttaa miehillä myös siittiöiden tuotantoon Sertolin solujen kautta. Sertolin solut eli kiveksen tukisolut ovat kiveksen siementiehyissä sijaitsevia soluja, joiden tehtävänä on ravita kehittyviä siittiöitä sekä säädellä spermatogeneesiä eli siittiöiden kypsymistä. Sertolin solut vastaavat osaltaan follitropiinin säätelystä. Ne erittävät inhibiini-hormonia, joka estää follitropiinin erittymistä aivolisäkkeen etulohkosta. Lapsilla lutropiinin pitoisuus on hyvin pieni, mutta se kasvaa murrosiässä ja siitä voidaan tutkia puberteettikehitystä. Vaihdevuosien alkaessa lutropiinin ja follitropiinin erityis kiihtyy estrogeenin tuotannon vähenemisen ja negatiivisen palautteen vaimenemisen takia, jolloin virtsaan erittyy runsaasti FSH:ta ja LH:ta. Gonadotropiineja kutsutaan tällöin menotropiineiksi.(5)

### 5.3.3 Istukkahormoni (hCG)

Istukkahormonin eli koriongonadotropiini on hiilihydraattipitoinen proteiini (glykoproteiini), joka muistuttaa rakenteeltaan lutropiinia ja follitropiinia. Istukkahormonin ensisijaisena tehtävänä on keltarauhasen progesteronituotannon turvaaminen alkuraskaudessa. Hormoni alkaa erittyä virtsaan jo useita päiviä ennen kuukautisten jäämistä pois ja sen pitoisuus on suurimmillaan 6-8 viikon kuluttua viimeisestä ovulaatiosta. Hormoni estää keltarauhasta surkastumasta ja keltarauhasen erittämät steroidit vuorostaan estävät kuukautisvuodon. Sen jälkeen istukkahormonin erityis vähenee, koska istukan oma progesteroni- ja estrogeenituotanto voimistuu. Istukkahormonilla on lutropiinin kaltainen vaikutus. Tätä vaikutusta hyödynnetään naisen ovulaation varmistamiseksi.

misessa ja miehen testosteronituotannon lisäämisessä. Myös raskaustestit perustuvat hCG:n osoittamiseen naisen virtsasta tai verestä. Nykyään testit ovat erittäin herkkiä ja mahdollinen raskaus voidaan todeta jo ennen kuukautisten jäämistä pois. (5,7)

#### 5.3.4 Estrogeeni

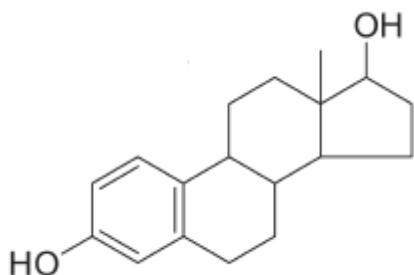
Ihmisen kolme tärkeintä estrogeenia ovat estradioli, estroni ja estrioli. Estrogeeneja syntyy pääasiassa munasarjoissa, mutta myös lisämunuaisten kuorikerroksissa, raskauden aikana istukassa sekä miehillä kiveksissä. Estrogeenit voidaan jakaa luonnollisiin, puolisynteettisiin ja synteettisiin estrogeeneihin. Niiden rakenteelle on ominaista fenolinen hydroksyyli steroidirungon A-renkaan kolmannessa hiiliatomissa. (5)

Estrogeenien kuten muidenkin steroidihormonien synteesien lähtöaine on kolesteroli. Sukupuolirauhasten eli gonadien solukalvon pinnalla on LDL-reseptoreja. Reseptoreihin sitoutuvat veressä kiertävät LDL-molekyylit, jonka jälkeen ne siirtyvät endosytoosiin avulla solun sisälle varastoitaviksi steroidisynteesiä varten. Endosytoosissa solu ottaa sisäänsä materiaalia solun ulkopuolelta muodostamalla solukalvolle kuopan, joka kuroutuu irti solukalvosta rakkulaksi solulimaan. Gonadotropiinit säätelevät puolestaan steroidien biosynteesiä. LH-hormonin vaikutus kohdistuu pääasiassa synteesiketjun alkuvaiheeseen, jolloin kolesteroli pilkkoutuu sytokromi P450 entsyymijärjestelmän katalysoimana pregnenoloniksi. FSH-hormonin vaikutus kohdistuu aromataasientsyymien aktiivisuuden säätelyyn. FSH kiihdyttää androsteenidionin ja testosteronin metaboloitumista estroniksi ja estradioliksi. Tämä estrogeenien synteesi tapahtuu lähinnä rasvakudoksen aromataasientsyymien katalysoimana miehillä ja vaihdevuosi-ikäisillä naisilla. (5)

Estrogeenit ovat rasvaliukoisia, jolloin ne läpäisevät helposti solu- ja tumakalvot. Rasvaliukoisuuden takia estrogeenien jakautumistilavuus on suuri ja proteiinisidoksesta vapautuvat estrogeenit siirtyvät nopeasti verenkierrosta kudoksiin. Solun sytoplasmassa ja tumassa sijaitsee estrogeenireseptorit, joissa estrogeenien vaikutus välittyy. Estrogeenireseptoreita on kahta päätyyppiä, alfa ja beeta. Niitä on löydetty lähes kaikista elimistön kudoksista, mutta niiden määrä eri kudoksissa vaihtelee. Estrogee-

nin sitoutuessa reseptoriinsa, tämä kompleksi kahdentuu ja sitoutuu tumassa oleviin kohdegeeneihinsä joko aktivoiden tai estäen niiden toiminnan. (5,6)

Estrogeenit vaikuttavat murrosiässä sekundääristen sukupuoliominaisuuksien muotoutumiseen ja ylläpitämiseen, kuten rintarauhasten kasvuun, rasvakudoksen naiselliseen jakautumiseen, karvoituksen lisääntymiseen genitaalialueilla, ihon kimmoisuuteen ja pehmeysen sekä koko luuston muotoutumiseen ja pitkien luiden epifyysien sulkeutumiseen. Tehokkain estrogeeni on estradioli (Kuvio 7), joka on hedelmällisessä iässä olevan naisen tärkein estrogeeni. Estradiolin pitoisuus vähenee vaihdevuosisia lähestyttäessä ja sen aikana tärkein estrogeeni on estroni. Raskauden aikana vaikuttaa puolestaan istukan tuottama estrioli. Estradiolia valmistetaan myös synteettisesti. Suomessa yleisin käytetty estrogeeni hormonikorvaushoidoissa on 17-beeta-estradioli. (5,6)



Kuvio 7. Estradiolin rakenne. (muunneltu 5.)

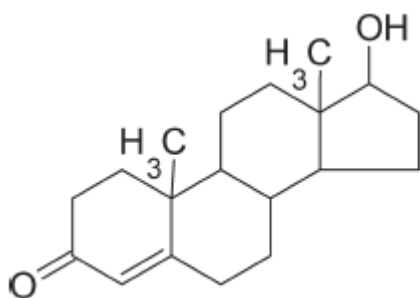
### 5.3.5 Testosteroni

Testosteroni (Kuvio 8) on sukupuolihormoni, jota erittyy sekä miehillä että naisilla. Miehillä sitä erittyy 2,5 - 11 mg vuorokaudessa ja naisilla vajaa kymmenesosa siitä. Naisilla erityis tapahtuu munasarjoissa ja lisämunuaisissa. Miehillä GnRH stimuloi gonadotropiinien eritystä, jotka edelleen stimuloivat kohdekudoksissa, kuten kiveksissä ja lisämunuaisissa, androgeenien ja siittiöiden tuotantoa. Testosteronia muodostuu eniten kivesten Leydigin soluissa. Testosteroni metaboloituu kudoksissa 5-alfareduktaasin vaikutuksesta aktiivisemmaksi dihydrotestosteroniksi ja edelleen estradioliksi aromataasientsyymin välityksellä. Testosteroni ja dihydrotestosteroni kiinnittyvät solun sisällä olevaan androgeenireseptoriin. Dihydrotestosteronilla on voimakkaampi androgeenivaikutus kuin testosteronilla, koska sen affiniteetti on korke-

ampi ja reseptorikompleksi on stabiilimpi. Testosteronin ja aromataasientsyymin aromataasio estradioliksi on tärkein estrogeenien synteesi miehillä ja postmenopausaalisilla naisilla. Miehillä muodostuu estrogeeniä noin 50 µg vuorokaudessa. Testosteronin tuotanto jatkuu miehillä vanhuusikään saakka. (5)

Testosteronin vaikutuksia kutsutaan myös androgeenisiksi vaikutuksiksi. Murrosiässä tapahtuva testosteronin lisääntyminen aiheuttaa siittimen, kivespussin, eturauhasen ja siemenrakkuloiden huomattavaa kasvamista. Testosteroni saa aikaan miesten sekundääriset sukupuoliominaisuudet, kuten lihasten kasvun, luuston maskuliinisen muodostumisen, ihon paksuuntumisen, pituuskasvun, ihonalaisen rasvan vähenemisen, äänen madaltumisen ja karvoituksen. Testosteroni vaikuttaa miehillä myös parankasvuun sekä kaljuuden varhaiseen ilmaantumiseen, varsinkin jos siihen on geneettistä taipumusta. Edellä mainittujen asioiden seuraamukseen kuuluu myös miehen roolin tiedostaminen. Naisilla testosteroni aiheuttaa muun muassa karvoittumista ja äänen madaltumista, mutta huomattavasti pienemmässä mittakaavassa kuin miehillä. (5)

Testosteroni on yksi voimakkaimmin anabolisesti vaikuttavista steroideista ja kaikki anaboliset steroidit ovat testosteronin johdannaisia. Testosteroni on rasvaliukoinen steroidi. Testosteroni lisää tiettyjen solujen proteiinisynteesiä vaikuttaen mikrosomaaliseen RNA-fraktioon. Vielä ei kuitenkaan tiedetä, mihin kaikkiin soluihin se vaikuttaa. (5)



Kuvio 8. Testosteronin rakenne. (muunneltu 5.)

## 6 SCHWANNIN SOLUT

### 6.1 Schwannin solut ääreishermostossa

Schwannin solut peittävät ääreishermoston aksoneiden pintaa. Schwannin solut jaotellaan neljään eri osaan, joita ovat myeliinia tuottavat, myeliinia tuottamattomat, perisynaptiset ja perifeeraalisten ganglioiden solut. Luokittelu perustuu solujen morfologiaan, biokemiallisiin ominaisuuksiin ja solujen neuronaaliseen ympäristöön, johon solut ovat yhteydessä. Myeliinia tuottavat Schwannin solut ovat parhaiten tunnettuja ja niiden tehtävänä on kiertyä moninkertaisesti ja tiukasti aksonin ympärille. Eri-tyyppiset Schwannin solut saavat alkunsa yksittäisistä prekursorisoluista, mitkä ilmentävät solujen tunnistuksessa käytettäviä markkeriproteiineja P0 (myeliini proteiini 0), GAP43 (kasvu välitteinen proteiini 43) ja F- spondiini. Prekursorisoluista muodostuu epäkypsiä Schwannin soluja, mitkä ilmentävät S100- ja P0- proteiinia. (20) Schwannin solujen tunnistamisessa on tavallisimmin käytetty antigeeni S100- proteiinia, jota ei ole muissa kasvaimen soluissa. (21)

Schwannin soluja peittää laminiinista ja kollageenista muodostuva tyvikalvo, joka suojaa soluja toimimalla tärkeänä aineiden ja solujen kulkeutumista säätelevänä rakenteena. Schwannin solujen tyvikalvot sisältävät laminiinin ketjuja B1, B2 ja M sekä tyypin IV kollageenia. Schwannin solut ilmentävät sekä kudoksessa että viljelmässä tyvikalvon edellä mainittuja rakenneproteiinien geenejä. Schwannin soluksoni ryhmittymien väliaine muodostuu hyytelömäisestä sidekudoksesta endoneuriumista. Sen tehtävänä on suojata aksoneita puristavilta voimilta. Schwannin solut ja fibroblastit tuottavat tätä kyseistä soluväliainetta. Schwannin solut liittyvät väliaineeseen ainakin osittain alfa 2/beeta 1- integriinireseptoreiden avulla. Integriinireseptorit koostuvat alfa ja beeta ketjutyypeistä, joita molempia tunnetaan useita erilaisia. Integriinireseptorit ovat solukalvon proteiineja, joiden avulla solu voi tarttua soluväli-tilan rakenneproteiineihin. Reseptorien sytoplasminen osa tarttuu välittävien proteiinien avulla solun tukirankaan. (21)

## 6.2 Schwannin solujen jakautumiseen vaikuttavia tekijöitä

Schwannin solujen oikea määrä aksonin ympärillä saavutetaan ohjelmoidulla solu-kuolemalla ja solujen kasvuun vaikuttavilla tekijöillä. Schwannin solujen proliferointia stimuloivan signaaloinnin oletetaan olevan osallisena aksonaalisen membraanin kanssa. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että aksonaalinen Schwannin solujen mitogeeni olisi sukua hereguliiniperheen kasvutekijöille. Hereguliini stimuloi solujen jakautumista aktivoimalla kasvutekijäreseptorinsa erbB:n, joita on kolmea erilaista erbB2, erbB3 ja erbB4. ErbB- reseptorin aktivoiminen johtaa puolestaan mitogeenia aktivoivan proteiinikinaasin (MAP) aktivaatioon, mikä aiheuttaa edelleen solujen jakaantumisen. Schwannin solujen kasvua voivat myös stimuloida fibroblastiset kasvutekijät ja verihitulekasvutekijä (PDGF)., mutta vain Schwannin solujen mitogeenien aktivoimana solun syklisen AMP:n tuotantoa. Syklinen AMP puolestaan aktivoi eteenpäin proteiinikinaasi A- entsyymiä. Syklinen AMP irrottaa proteiinikinaasi A:sta (PKA) katalyyttisiä alayksiköitä niin, että ne aktivoituvat. PKA:n katalyyttinen alayksikkö kiinnittää puolestaan fosfaattia solussa oleviin proteiineihin ja se saa aikaan solussa vasteita (fosforylaation), kuten CREB- proteiineja, jotka vaikuttavat puolestaan geenien luentaan. Tutkimusten mukaan forskoliinin läsnäolo Schwannin solujen kasvatuksessa stimuloi yhdessä hereguliinin kanssa solujen kasvua. Forskoliinin lisääminen kasvatusmediumiin ilman hereguliinia ei vaikuttanut solujen kasvuun mitenkään. Forskoliinilla ei ollut vaikutusta hereguliinin kasvureseptoreiden aktivoitumiseen, oli hereguliini läsnä tai ei. (24)

## 6.3 Schwannin solujen viljelyssä huomioitavia asioita

Schwannin soluja kasvatetaan vain coutatuilla eli päällystetyillä kasvatusalustoilla. Couttauksen tarkoituksena on se, että päällystysaineet matkivat soluväliainetta. Kasvatusalustat päällystetään sekä poly-L-lysiinillä että laminiinilla.(1)

Toinen tärkeä asia, mikä pitää huomioida Schwannin solujen viljelemisessä ja mahdollisissa ainetestauksissa soluilla on mediumin vaikutus. Tutkimukset (22) ovat osoittaneet, että punaisessa D-MEM:ssä punaisena väriaineena oleva fenosulfoliftaleiini eli fenolin puna on estrogenin kaltainen jäljittelijä. Fenolin punaa käytetään so-



lujen kasvatusmediuimeissa pH- indikaattorina. Fenolin punan rakenne muistuttaa huomattavan paljon estrogeenin rakennetta, jolloin fenolin punalla on taipumusta tarttua solujen estrogeenireseptoriin. Fenolin punalla on merkittävä estrogeeninen aktiivisuus jo yleisimpien kasvatusmediumien sisältävillä fenolin puna pitoisuuksilla (15-45µM). Tämä aiheuttaa estrogeenille reagoivien solujen jakautumisen lisääntymistä ja tiettyjen proteiinien synteesejä (22). Fenolin punassa ja estrogeenien rakenteessa oleva fenolinen hydroksyyli-ryhmä sijaitsee rakenteellisesti tärkeässä kohdassa, mikä mahdollistaa estrogeenien metabolialle tärkeät konjugaatioreaktiot. Fenolin punan läsnäolon mediumissa on todettu aiheuttavan tietyille soluille jopa 50 prosentin kasvun lisääntymisen verrattuna solujen kasvamista vastaavassa värittömässä mediumissa. (23)

#### 6.4 Schwannin solujen testaus BrdU ELISA – määrityksellä

Eräs perinteinen tapa mitata solujen jakautumista on <sup>3</sup>H-tymidiinin inkorporaatio. Kyseisessä menetelmässä on haittapuolensa muun muassa sen takia, että siinä käytetään radioaktiivista leimausmenetelmää. Rinnalle on saatu yhtä tehokas solujen jakautumista mittaava menetelmä 5-bromi-2-deoksiuridiini (BrdU) ELISA -määritys. (17) Miller ja Nowakowski (26) ovat esitelleet kyseisen menetelmän jo vuonna 1988, joten ihan uudesta menetelmästä ei ole kyse. BrdU – määritys on todettu käyttökelpoiseksi useissa eri tutkimuksissa in vitro ja in vivo. (18)

BrdU Cell Proliferation Assay Kit sisältää 1000 näytteelle tarvittavat aineet. Soluja kasvatetaan 96-kaivon levyllä ja soluja inkuboidaan BrdU:lla 2-24 tuntia. Valmistajan mukaan BrdU menetelmä perustuu siihen, että solunjakautumisen s-faasivaiheessa BrdU sitoutuu thymidiinin paikalle DNA- juosteessa. Mitä enemmän solut jakautuvat, sitä enemmän BrdU:ta sitoutuu solujen DNA:han. Medium poistetaan ja solut denaturoidaan 70 %:lla etanolilla, jotta myöhemmin laitettava vasta-aine pääsee sitoutumaan solujen DNA:han. Denaturaatiossa orgaanisen liuoksen kuten alkoholin tarkoitus on se, että se poistaa solukalvon lipidejä ja dehydroi solun ja saat-  
taa samalla denaturoida eli tuhota solukalvolla ilmentyvien proteiinien antigeenit. (17)

Solut blokataan blokkauksiliuoksella, koska se vähentää vasta-aineen epäspesifistä tarttumista ja sitä kautta vääriä positiivisia tuloksia. Sen jälkeen levyille laitetaan anti-BrdU, johon on yhdistetty peroksidaasi (POD). Tämä vasta-aine sitoutuu solussa antigeeniin eli uuteen syntetisoituun BrdU:ta sisältävään DNA:han. Solut pestään fosfaattipuskuriliuoksella epäspesifisen tarttumisen vähentämiseksi. Sen jälkeen solun DNA:han kiinnittyneet BrdU ja anti-BrdU-POD havaitaan inkuboimalla soluja entsyymien substraattiliuoksessa (tetrametyyli-bentsidiini, TMB). POD entsyymi metaboloii TMB substraatin kanssa ja reaktion lopputuotteena on silmilläkin havaittava sininen värillinen yhdiste. Reaktio pysäytetään 1M rikkihapolla, jolloin yhdisteestä saadaan keltainen. Spektrofotometrillä mitataan näkyvän valon absorptiota 450 nm suodattimella. Mitä enemmän solut ovat jakautuneet, sitä vahvempi on värinmuodostus ja sitä enemmän se absorboi valoa sekä sitä suurempi on sen absorbanssi. Tuloksesta saadaan numeerista dataa eli absorbanssilukemia. (17)

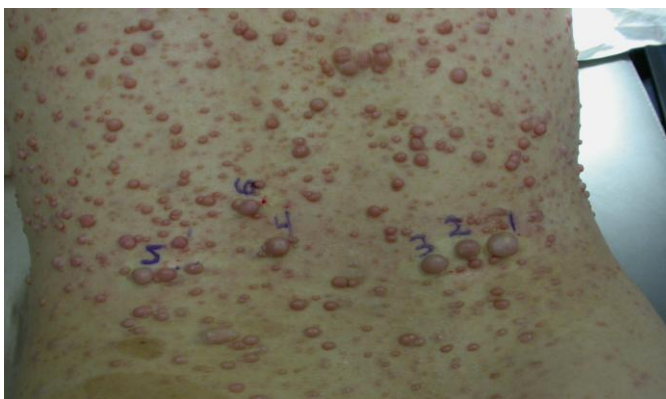
Menetelmä on erittäin herkkä ja toistettava. Pienetkin muutokset solujen jakautumisessa on huomioitavissa sen avulla. Menetelmällä on kuitenkin rajattu lineaarinen alue, jolla solujen jakautuminen voidaan vielä luotettavasti todeta. Menetelmää voidaan käyttää useille eri soluille, mutta se pitää validoida sopivaksi kullekin eri soluille. Määrityksen tekeminen 96-kaivon levyllä säästää soluja, mediumia ja aineita verrattuna moniin muihin solujen jakautumista mittaaviin määrittäksiin. Sen takia määrittäksellä on hyvä tutkia erilaisten kasvutekijöiden vaikutuksia soluihin. (17)

## 7 TUTKIMUKSESSÄ KÄYTETYT MENETELMÄT

### 7.1 Potilaat ja kasvaimet

Tutkimukseen käytettävät kasvaimet eli neurofibroomat noudettiin Turun yliopistolaisesta sairaalasta (TYKS) ihotautiklinikan osastolta. Ihotautien erikoislääkäri Sirkku Peltonen poisti neurofibroomia CO<sub>2</sub>-laserilla potilaista, jotka sairastivat tyypin 1 neurofibromatoosia. Poistettavat kasvaimet numeroitiin ja kuvattiin ennen poistamista (kuva 2). Isommat tuumorit (>0,5cm Ø) laitettiin 10 prosenttiseen formaliiniin ja seuraavana päivänä 70 prosenttiseen etanoliin tai kasvaimet pakastettiin -70 °C:een

muuta määrittelyä varten. Pienemmät kasvaimet ( $\leq 0,5\text{cm } \varnothing$ ) otettiin viljelyyn. Kasvainten käyttöön tutkimuksessa oli sekä Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan ja TYKS:n ihotautien klinikan että kunkin potilaan itse allekirjoittama lupa.



Kuva 2. Neurofibroomia. Poistettavat kasvaimet on merkattu juoksevilla numerolla ennen laserointia.

## 7.2 Tutkimuksessa käytetyt aineet

Taulukkoon 1 on listattu aakkosjärjestyksessä aineet, joita on käytetty tutkimuksen aikana. Myös valmistajat ja tuotenumerot sekä aineiden pääasiallinen käyttötarkoitus löytyvät taulukosta.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt soluviljelyyn liittyvät reagenssit. Tuotteiden nimet ovat englanniksi.

Tuote	Valmistaja	Tuotenro.	Käyttötarkoitus
Beta1- heregulin	Sigma	H 7660	Mitogeeninen vaikutus eli nopeuttaa Schwannin solujen jakaantumista sitoutumalla ja aktivoimalla solukalvon tyrosiinikinaasireseptoreita.
Blocking reagent for ELISA	Roche	11112589001	blokkauksiuos BrdU- määrittelyyn
BrdU-kit	Roche	11647229001	ELISA- määrittystä varten
Dispase grade 1	Roche	1 284 908	Proteaasi eli hajottaa proteiineja
D-MEM (punainen)	Gibco	41966-029	Schwannin solujen kasvatusmedium pullovaiheessa. Tarjoaa ravinteet soluille
D-MEM (väritön)	Gibco	31053-028	Schwannin solujen kasvatusmedium hormoneita tutkittaessa
F12	Gibco	21765-029	Kasvatusmedium
FBS	Gibco	16000-044	Sisältää soluille tarvittavat kasvutekijät, mineraalit ja hormonit
Forskolin	Sigma	F-6886	Stimuloi +/- Schwannin solujen kasvua sekä hetkellisesti käytettynä myös -/- solujen kasvua. Sen tiedetään myös kiihdyttävän syklisen AMP:n toimintaa, joka edes auttaa Schwannin solujen jakaantumista.
Fungizone	Bio-Whittaker	17-836R	Estää iho - ja sieni-infektioita
IBMX	Sigma	I-5879	Inhiboi syklisen AMP PDE (phosphodiesterase) toimintaa.
Insulin	Sigma	I-6634	Ohjaa glukoosin kulkua solukalvojen läpi
Collagenase Type 1	Sigma	C-0130	Sopii ihmisen kasvaimen hajottamiseen. Hajottaa kudoksen rakenneproteiineja, jotka ylläpitävät kudoksen rakennetta.
L-glutamine	Gibco	25030	Lisätään värittömään D-MEM:iin sama määrä kuin punaisessa D-MEM:ssä.
N2-supplement	Gibco	17502-048	Stimuloi hermoperäisten kasvaimien kasvua.
Natural Mouse Laminin	Invitrogen	23017-015	Tarttumisalusta soluille kasvatusalustalla. Matkii soluväliainetta.
PBS	Sigma	D8537	Fosfaatti-puskuroitu suolaliuos, joka pitää pH:n vakiona ja sisältää yhtä monta ionia/U kuin on solun sisällä eli estää soluja kutistumasta tai hajoamasta.
Penicillin Streptomycin	Gibco	15140-122	Estää tietyt mikrobikontaminaatiot
Poly- L-lysine	Sigma	P-1524	Tarttumisalusta soluille kasvatusalustalla
RPMI-medium	Gibco	52400-025	Edullinen medium kasvainnäytteiden hakemiseen TYKS:stä
Sodium pyruvate	Gibco	11360	Lisätään värittömään D-MEM:iin sama määrä kuin punaisessa D-MEM:ssä.
trypsin-EDTA 0,05%	Gibco	25300-062	Solujen irrottamiseen kasvualustasta

### 7.3 Schwannin solujen viljely

Schwannin solujen viljely on kuvattu muun muassa Serran (13) ja Rosenbaumin (19) tutkimuksissa. Tutkimukseeni liittyvä Schwannin solujen viljelymenetelmä on peräisin niistä. Schwannin solujen viljelyprotokolla on liitteenä 1.

Viljelyssä käytettävät kasvaimet haettiin TYKS:stä ja käsiteltiin heti sen jälkeen soluviljelytiloissa. Jokainen TYKS:stä saatu tuumori käsiteltiin erillisenä näytteenä. Tuumorit laitettiin 15 ml:n falconputkiin (BD Bioscience, USA), joissa oli noin 3 ml RPMI- 1640- mediumia (Gibco, Uusi-Seelanti) sekä penicillin streptomyciniä 1/10 (Gibco). Potilaat sekä heistä laseroidut tuumorit oli merkattu kirjaimella sekä juoksevalle numerolla ja nämä tiedot merkittiin tutkimusryhmän omaan tietokantaan.

Seuraavat työvaiheet tehtiin soluviljelyssä laminaarikaapissa steriilisti. Ensin tuumoreista poistettiin jäljelle jäänyt iho. Sen jälkeen tuumori pilkottiin noin Ø 3 mm:n palloiksi. Palat siirrettiin 50 ml:n falconputkeen, jossa oli preinkubaatiomediumia. Preinkubaatiomedium koostui D-MEM:stä (Gibco, Uusi-Seelanti), 10 % FBS:sta (Gibco, UK), 5 % penicillin streptomyciinistä:stä, 2 µM Forskolinista:sta (Sigma) ja 1:200 Fungizonesta (Bio-Whittaker). Tuumoria preinkuboitiin kolme vuorokautta (5 % CO<sub>2</sub>, +37 °C).

Preinkuboinnin jälkeen tehtiin tuumorin kemiallinen ja mekaaninen hajotus. Tuumorin palasia inkuboitiin 18–24 tuntia (5 % CO<sub>2</sub>, +37 °C) dissosiaatiomediumissa: D-MEM (Gibco, Uusi-Seelanti), 10 % FBS (Gibco, UK), 160 U/ml collagenase type 1 (Sigma) ja 0,8 U/ml Dispase grade 1 (Roche). Inkuboinnin jälkeen kasvaimen palat hajotettiin erikokoisilla pipetinkärjillä suspensoimalla. Tuumorista saatu solupopulaatio sentrifugoitiin (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0, 400g, 10 min). Sentrifugoinnin jälkeen solupelletti suspensoitiin D-MEM:iin, jotta saatiin dissosiaatiomedium pestyä pois. Solut sentrifugoitiin uudelleen ja saatu solupelletti suspensoitiin +/- proliferaatiomediumiin (Taulukko 2) ja laitettiin kasvamaan coutatuille eli päällystetyille kasvualustoille.

Viljelyalustat päällystettiin ensin Poly-L-lysiinillä 1mg/ml (Sigma, USA) tunnin ajan ja huuhdeltiin kerran puskuriliuksella (PBS, Gibco). Sen jälkeen viljelyalustat käsi-

teltiin tunnin ajan +37 °C:ssa laminiiniliuoksella 4µg/ml (Invitrogen, USA), jonka jälkeen viljelyalustat taas pestiin PBS:llä.

Taulukko 2. Proliferaatiomedium - ohje SC+/- ja SC-/- soluille. (SC on lyhenne Schwannin soluille.)

Proliferaatiomedium (SC+/-):		Proliferaatiomedium (SC-/-):	
DMEM		DMEM	
FBS USA	10 %	FBS USA	10 %
PS	100 U/ml; 1 %	PS	100 U/ml; 1 %
IBMX	0,5 mM	IBMX	0,5 mM
Beta1-herregulin	10 nM	Beta1-herregulin	10 nM
Insulin	2.5 µg/ml	Insulin	2.5 µg/ml
Forskolin	0,5 µM		

Solut oli tarkoitus erilaistaa joko SC+/- soluiksi tai SC-/- soluiksi. Puolet edellisenä päivänä kasvamaan laitetuista soluista sai -/- soluille tarkoitetun käsittelyn. -/- solut käsiteltiin ensin yön yli N<sub>2</sub>- mediumilla; D-MEM 73 %, F12- medium 25 %, penicillin streptomycin 1 % ja N<sub>2</sub>-supplementti 1 % (5 % CO<sub>2</sub>, +37 °C). Seuraavana päivänä -/- soluille vaihdettiin ilman forskoliinia oleva proliferaatiomedium.

Solujen kasvatusneste vaihdettiin 3-4 päivän välein. Pullovaiheessa olevien viljelmien kasvatusnesteestä vaihdettiin vain puolet tilavuudesta. Passagessa 0 soluja kasvatettiin 6-kaivon levyllä ja silloin vaihdettiin koko kasvatusneste tilavuus uuteen. Siten saatiin viljelmiä siistimmän näköiseksi ja irtonaiset solut pois. Soluja viljeltiin 6-kaivon levyllä (NUNC) passageen 1 tai 2. Sen jälkeen solut laitettiin kasvamaan T25- tai T75- pulloihin. Solut irrotettiin kasvualustasta 0,05 % trypsiini-EDTA:lla, kun solut olivat 70- 80 % konfluentteja.

Trypsiini-EDTA sulatettiin lämpökaapissa (+37 °C). Mediumit imettiin pois kasvualustoista ja solut pestiin kerran steriilillä 1 x PBS:llä, minkä jälkeen solujen päälle pipetoitiin trypsiini-EDTA- liuosta. Trypsiinin annettiin vaikuttaa hiilidioksidikaapissa noin viisi minuuttia. Solujen irtoamista seurattiin mikroskoopilla. Levyä tai pulloa ravisteltiin voimakkaasti solujen irtoamisen edistämiseksi. Kun solut olivat irronneet, trypsiini-EDTA inaktivoitiin seerumia sisältävällä mediumilla (DMEM +

10 % FBS) ja solususpensio siirrettiin 15 ml:n sentrifuugiputkiin trypsiini-EDTA:n sentrifugoimiseksi pois (400g, 10 min). Sen jälkeen supernatantti imettiin pois ja solupelletti suspensioitiin tarvittavaan määrään proliferaatiomediumia.

Solujen pakastus suoritettiin tarvittaessa solujen trypsinoinnin jälkeen. Sentrifuugista saatu solupelletti pipetoitiin solujen pakastusmediumiin, joka koostui 10 % DMSO:sta ja 90 % FBS:stä. Sen jälkeen solut laitettiin solujen pakastusrasiaan ja välittömästi  $-70^{\circ}\text{C}$ :een ja seuraavana päivänä solut vietiin  $-196^{\circ}\text{C}$ :een. Esimerkiksi T75 pullosta pakastettiin kaksi ampullia soluja. Yhteen ampulliin pipetoitiin 1 ml pakastusmediumia. Kun solut haluttiin sulattaa soluviljelmiä varten, tuli ne sulattaa nopeasti. Ensin sulatettu solupakastusmedium suspensio sentrifugoitiin (400g, 5 minuuttia) ja laitettiin saatu solupelletti kasvatusmediumiin sekä pipetoitiin se kasvatusalustalle.

#### 7.4 Protokollan hakeminen ELISA- määrittelykselle ja hormonitestaukset

Viljelmissä käytettiin mahdollisimman puhtaita Schwannin soluviljelmiä. Ensimmäisessä testauksessa soluja pleitattiin 96-kaivon levyille eri määriä. Yhdelle 96 - kaivon levyn kaivolle pleitattiin 250, 500, 1000 tai 2000 solua. Mediumina käytettiin D-MEM:ä, jossa oli 1 % tai 10 % FBS seerumi. Solumääriä testattiin sekä +/- että -/- solukannoilla. BrdU ELISA- määrittelyksessä käytettiin 4 tunnin BrdU vaikutusaikaa. Tästä saadut tulokset eivät tuottaneet haluttua lopputulosta, joten siirryttiin seuraavaan testaukseen.

Toisessa testauksessa haluttiin testata isompia solumääriä ja BrdU:n vaikutusaikaa. Mediumina käytettiin proliferaatiomediumia, mikä oli valmistettu punaisesta D-MEM:stä. Forskoliinia ei lisätty levykasvatuksiin ollenkaan. Testattavana olivat solumäärät 250 – 6000 solua/kaivo. Päivänä 2 testattiin 4 tunnin BrdU:n vaikutusaikaa ja päivänä 4 testattiin 4 ja 24 tunnin vaikutusajoja. Tarkoituksena oli löytää solumäärä, jonka absorbanssilukemat olisivat sopivat, jolloin testattavien aineiden vaikutus olisi vielä selvästi havaittavissa.

Kolmantena testattiin mediumin, solumäärän ja BrdU:n vaikutusaikaa. Soluja pleitattiin 96- levyn kaivoille 6000, 10 000, 20 000 ja 50 000 solua/kaivo. BrdU:n vaikutusaika oli 18 h. Mediumina käytettiin punaista tai väritöntä D-MEM proliferaatiomediumia. Tarkoituksena oli testata kahden erilaisen mediumin vaikutus Schwannin solujen jakautumiselle.

Kun protokolla hormonien testaamiseen oli tehty, voitiin aloittaa hormonien testaus Schwannin soluilla. Testattavina hormoneina olivat testosteroni (Sigma, Fluka, 86500),  $\beta$ -estradiol (Sigma, E2758) ja hCG (Sigma, C0684). Estradioli ja testosteroni laimennettiin 96 % etanoliin sekä hCG laimennettiin steriiliin dH<sub>2</sub>O:een. Hormoneista testattiin pitoisuudet 0,001 nm, 0,1 nm, 10 nm ja 100 nm.

## 7.5 BrdU ELISA -määrittäminen

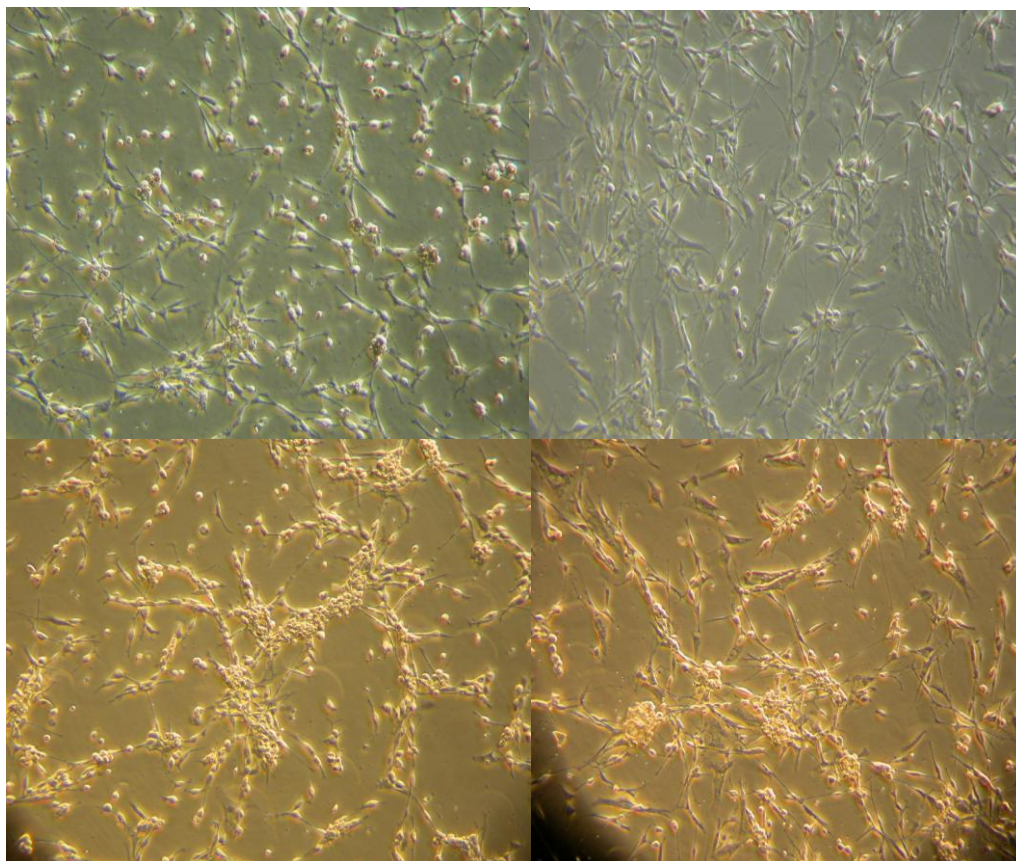
Soluja pleitattiin medium – ja hormonitestauksia varten 96- levyn kaivoille eri määriä. Solut pleitattiin 100  $\mu$ l tilavuudessa 96- levyn kaivoille päivänä 0. Mediumina käytettiin väritöntä D-MEM proliferaatiomediumia. Solujen jakautumista mitattiin päivänä kaksi ja neljä. Soluja inkuboitettiin BrdU:lla 18 tuntia ennen kuin ne fiksoitiin etanolilla 30 minuutin ajan. Etanolin poistamisen jälkeen solut käsiteltiin blokkausliuoksella 30 minuutin ajan. Sekä etanolia että blokkausliuosta pipetoitiin 200  $\mu$ l/kaivo. Blokkausliuos poistettiin ja tilalle laitettiin 100  $\mu$ l/kaivo Anti-BrdU-POD- liuosta 60 minuutin ajaksi. Sen jälkeen kaivot pestiin viisi kertaa 1 x PBS liuoksella. Seuraavaksi soluja inkuboitettiin 30 minuuttia substraattiliuoksella ja reaktio pysäytettiin 25  $\mu$ l/kaivo 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla. Solujen jakautumien mitattiin spektrofotometrillä 450nm suodattimella viiden minuutin sisällä reaktion pysäyttämistä. Tuloksena saatava numeerinen data käsiteltiin Microsoft Excel- ohjelmalla. ELISA - määrittämissen protokolla on opinnäytetyön liitteenä 3. Liitteenä 2 on esimerkkinä 96- levyn hormonitestauksista tehty pipetointikaavio.



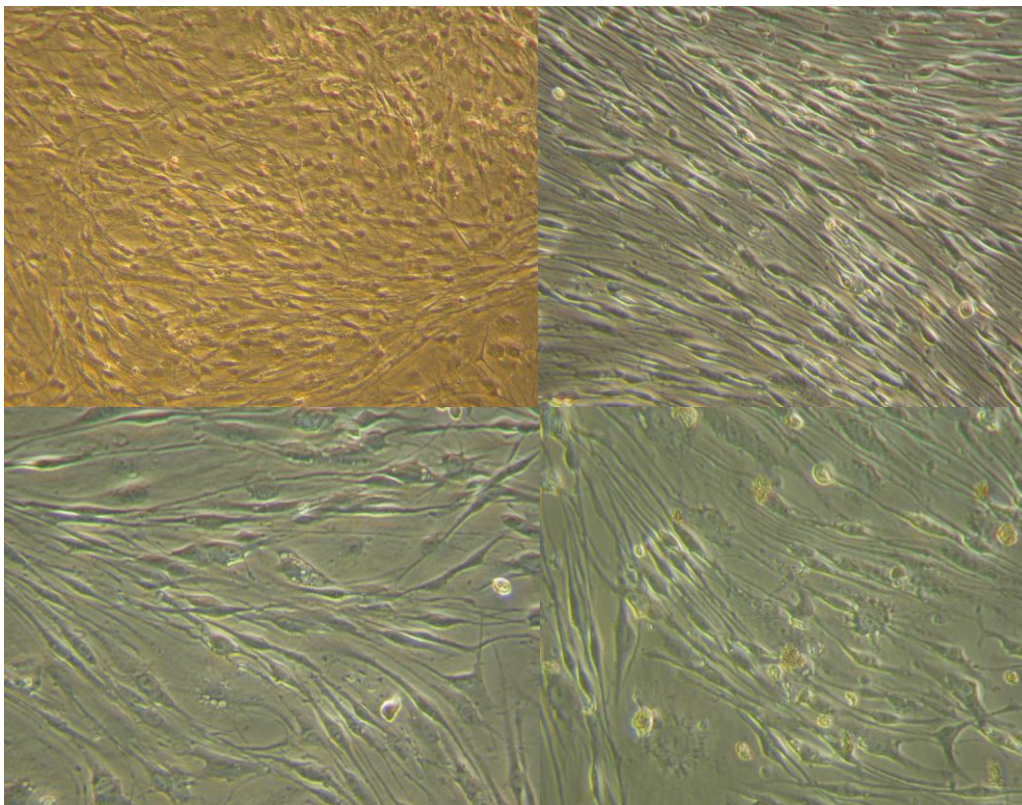
## 8 TUTKIMUKSEN TULOKSET

### 8.1 Schwannin solujen viljely

Schwannin +/- ja -/- solukantojen rakenne oli tunnistettavissa. -/- Schwannin soluviljelmät olivat puhtaamman näköisiä, yksittäiset Schwannin solut olivat lyhyempiä ja -/- solut kasvoivat harvemmassa kuin +/- solut. -/- solujen kasvupotentiaali oli lyhyempi kuin +/- solujen. Ne kasvoivat hyvin passageen 5 asti, mutta sen jälkeen -/- solut alkoivat irrota kasvualustaltaan ja forskoliinilla käsittely ei elvyttänyt soluja entiselleen. Forskoliinilla käsittely auttoi eniten -/- solujen elpymistä ennen passagea 5 tehtyjä viljelmiä. Forskoliinikäsittelyssä -/- solut saivat muutaman päivän ajaksi +/- mediumia, jossa oli forskoliinia mukana. +/- solut kasvoivat tiheästi, viljelmät olivat epäpuhtaampia, yksittäiset Schwannin solut pitkiä ja solut kasvoivat useita passageita. +/- solujen viljelmistä tuli sitä puhtaampia mitä myöhemmän vaiheen passage oli kyseessä. Soluja kasvatettiin jopa passageen 12. Kuvissa 3 ja 4 on nähtävissä solukantojen eroavaisuudet.



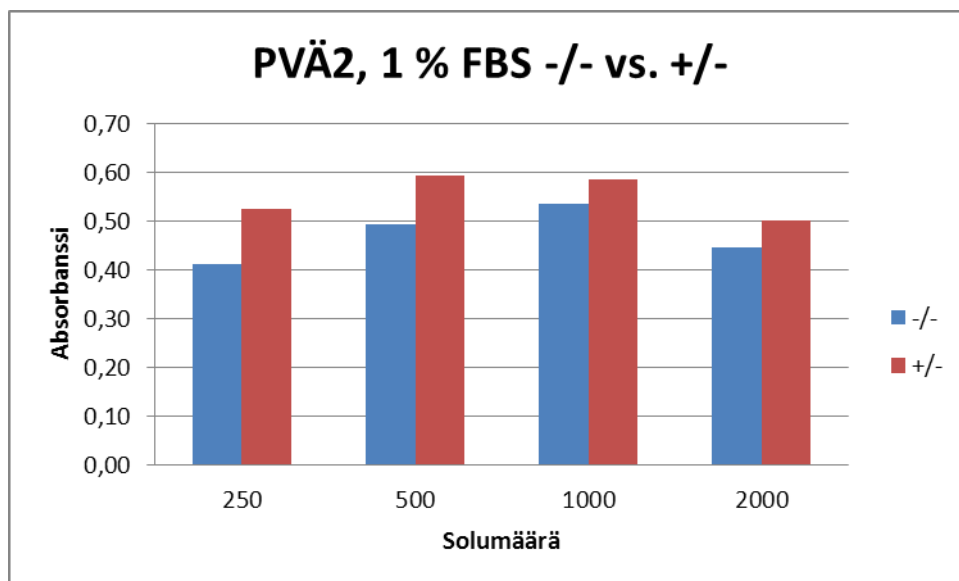
Kuva 3. Faasikontrastimikroskoopilla otetut kuvat -/- soluista 10x- suurennoksella.



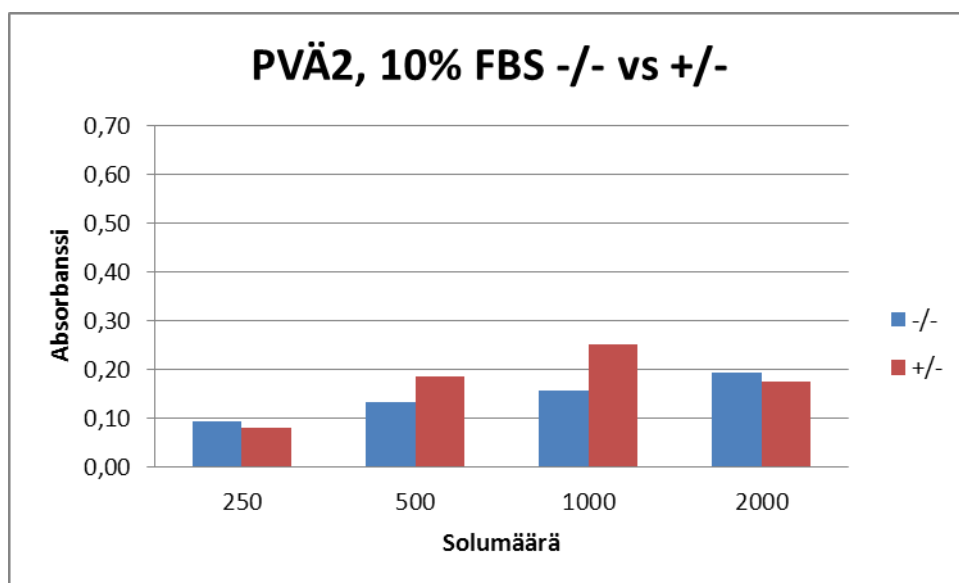
Kuva 4. Faasikontrastimikroskoopilla otetut kuvat +/- soluista 10x- suurennoksella.

## 8.2 Protokollan hakeminen BrdU ELISA- määrittelykselle

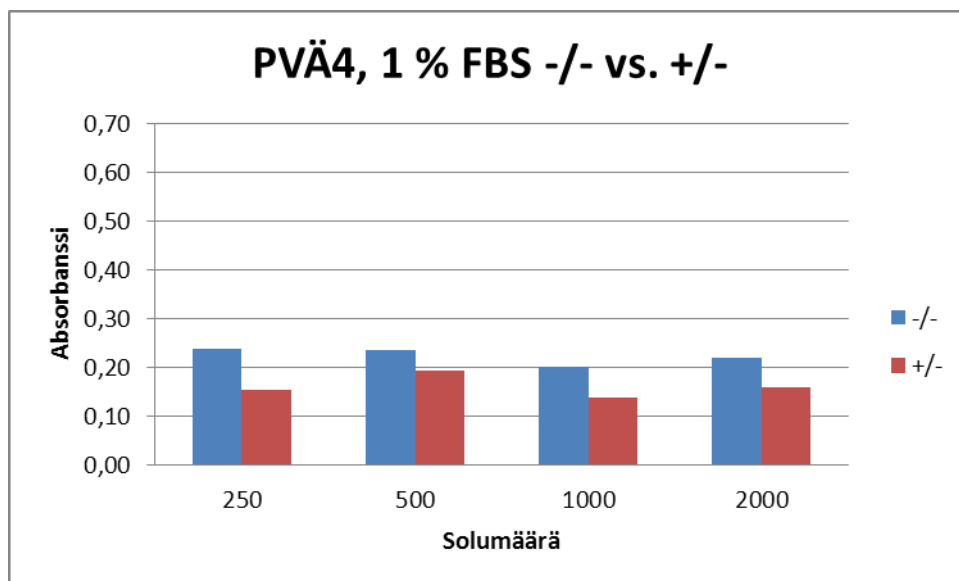
Ensimmäisessä solumäärätestauksessa testattiin solumääriä 250, 500, 1000 tai 2000 BrdU ELISA -määrittelyksen avulla. Soluja kasvatettiin 1 ja 10 %:ssa FBS mediumissa. Päivän 2 mittauksissa 1 % FBS mediumissa kasvatetut -/- ja +/- solut näyttivät kasvavan hyvin absorbanssilukuja katsottaessa. Päivän 2 mittauksissa 10 % FBS mediumissa kasvatetut -/- ja +/- solut eivät jaksaneet enää kasvaa. Solujen kasvupotentiaali oli käytetty loppuun jo päivänä 2. Solujen mikroskopiointi osoitti sen, että Schwannin solut olivat lähes kokonaan hävinneet ja fibroblastit sekä muut solut olivat vallanneet 96- levyn kaivot kasvualustakseen. Päivän 4 mittaukset osoittivat sen, että solut kasvoivat entistä huonommin ja näyttivät entistä huonommilla mikroskopiointaessa. Tämä protokolla ei tuottanut toivottuja tuloksia. Tulokset osoittivat sen, että jatkossa tuli testata solujen kasvamista proliferaatiomediumissa isommilla solumäärillä. Tulokset ovat näkyvissä kuvissa 9, 10, 11 ja 12.



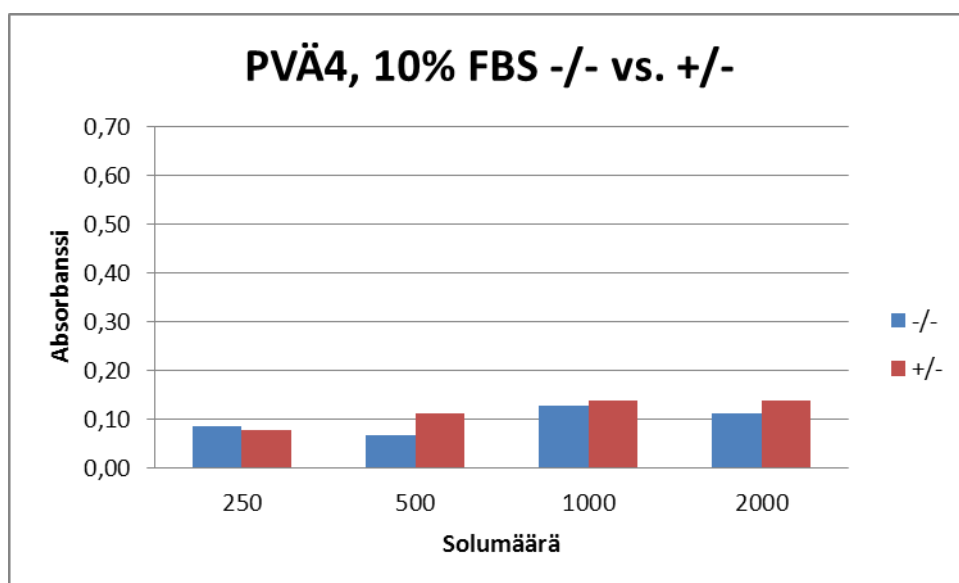
Kuvio 9. Päivän 2 mittaustulokset 1 % FBS – mediumissa. Absorbanssilukemat osoittavat ensi katsomalta -/- ja +/- solujen kasvavan päivänä 2 hyvin 96-levyn kai-voilla. Solujen mikroskopointi kertoo kuitenkin sen, että 1 % FBS mediumissa Schwannin solut kuolevat nopeasti ja muut solut kuten fibroblastit alkavat kasvaa vauhdilla. (Absorbanssi 450 nm.)



Kuvio 10. Päivän 2 mittaustulokset 10 % FBS – mediumissa. -/- ja +/- solujen kasvupotentiaali on käytetty loppuun jo päivänä 2, kun soluja on kasvatettu 10 % FBS mediumissa. (Absorbanssi 450 nm.)



Kuvio 11. Päivän 4 mittaustulokset 1 % FBS – mediumissa. Solujen kasvupotentiaali laski edelleen päivänä 4. Mikroskopointi osoitti vain fibroblastien olevan hengissä ja Schwannin solujen kadonneen. (Absorbanssi 450 nm.)



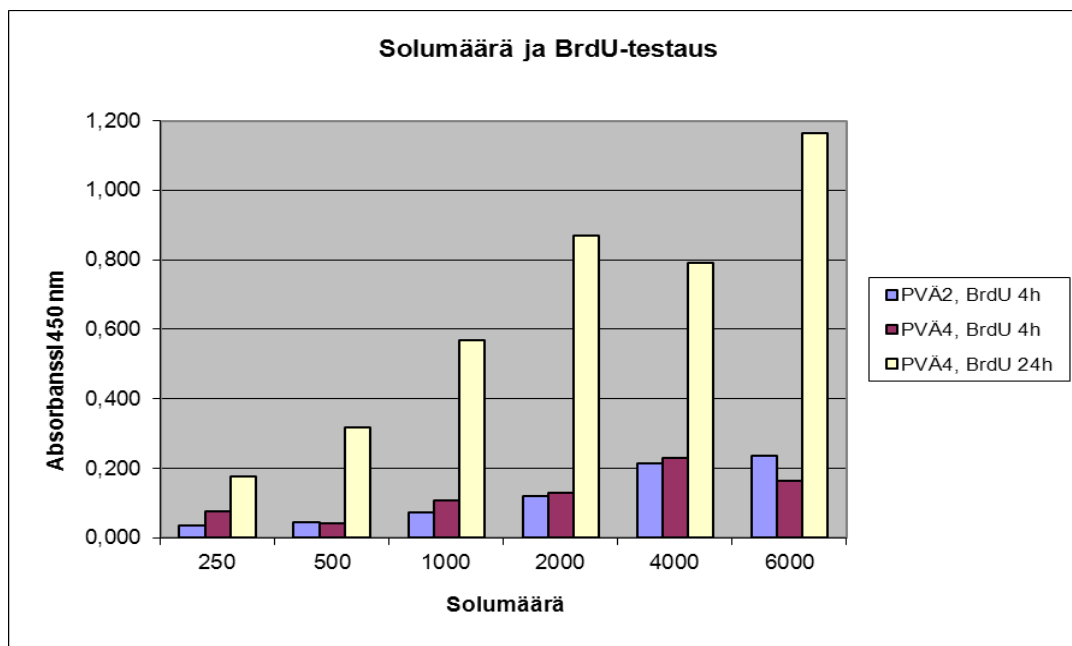
Kuvio 12. Päivän 4 mittaustulokset 10 % FBS – mediumissa. Absorbanssilukemat osoittavat solujen kasvupotentiaalin huonoksi edellä mainituissa kasvuolosuhteissa. (Absorbanssi 450 nm.)

Seuraavaksi tehdyssä solumäärä ja BrdU:n vaikutusaika testauksessa saadut tulokset kertoivat uutta tietoa Schwannin solujen kasvatuksesta. Tulokset on tiivistetty taulukkoon 3.

Taulukko 3. Tuloksia tiivistettynä.

Schwannin soluja voidaan kasvattaa 96- levyn kaivoilla.
Schwannin soluja voi laskea tietyn/halutun määrän.
Proliferaatiomedium BrdU ELISA - määrittelykseen.
BrdU:n vaikutusaika pitäisi olla yli 4 tuntia, mutta alle 24 tuntia.
Alle 6000 solua/kaivo ei kannata käyttää.

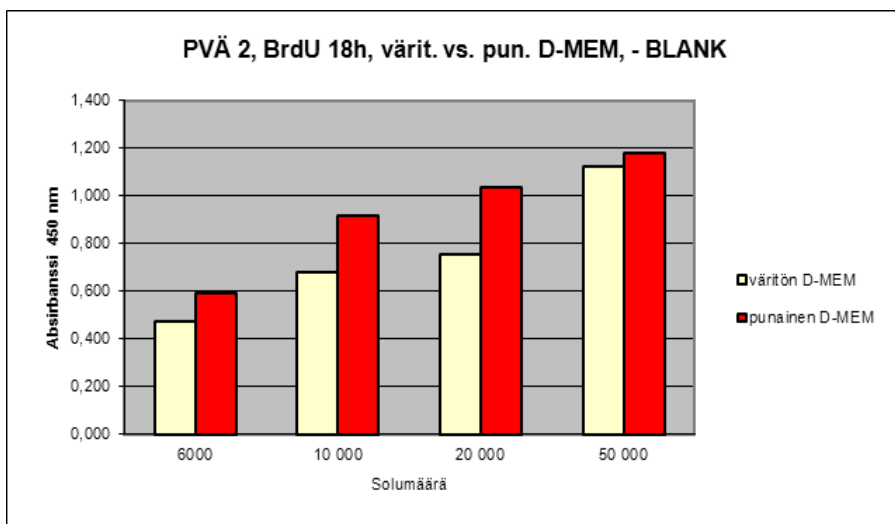
Tuloksista huomattiin, että Schwannin soluja voitiin kasvattaa 96- levyn kaivoilla, ja laskea soluille tarkka solumäärä. Alle 6000 solua/kaivo ei kannattanut käyttää, koska absorbanssilukemat olivat liian alhaiset. Proliferaatiomediumin käyttö oli hyvä ratkaisu, koska siten Schwannin solut saivat tarvitsemaansa ravintoa ja solut jakautuivat tasaisesti. Päivän 4 mittautuloksissa 4 tunnin BrdU:n vaikutusajalla absorbanssilukemissa oli hajontaa. BrdU:n vaikutusaika täytyi olla enemmän kuin 4 tuntia, koska solut jakautuvat hitaasti. 24 tunnin BrdU:n vaikutusaika oli taas liian pitkä, koska absorbanssilukemat olivat 6000 solua/kaivo liian korkeat ja sama solumäärä 2 päivän mittautuloksissa vaikutti lupaavalta. Absorbanssilukemien tulisi olla 0,3 – 0,8 lukemien alueella, jotta testattavien aineiden inhiboiva tai stimuloiva vaikutus olisi vielä selvästi havaittavissa. Protokolla vaati vielä testaamista. Solumäärä ja BrdU:n vaikutusaika testauksen tulokset ovat näkyvissä kuviossa 13.



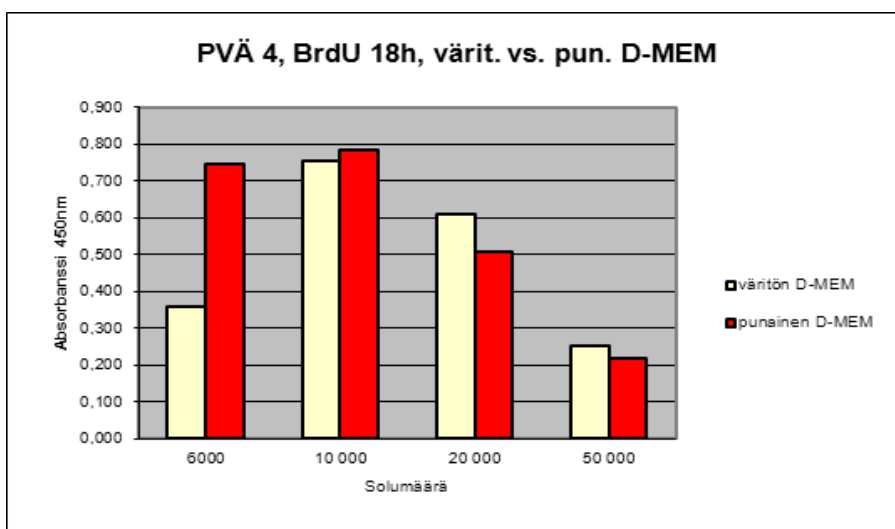
Kuvio 13. Solumäärä ja BrdU:n vaikutusaika testaus. Eriväriset pylväät kuvaavat eri päivien mittauksia. Tulokset osoittivat sen, että soluja pitäisi olla vähintään 6000 solua/kaivo. Sitä pienemmät solumäärät antoivat liian alhaisia absorbanssilukemia. BrdU:n vaikutusajalla oli paljon merkitystä. Neljän tunnin vaikutusaika aiheutti tuloksissa hajontaa solumäärien välille ja 24 tunnin vaikutusaika antoi puolestaan liian suuria absorbanssilukemia. Proliferaatiomediumin käyttö, hieman alle 24 tunnin BrdU:n vaikutusaika ja 6000 solua/kaivo alkoivat vaikuttaa hyviltä.

Kolmannessa testauksessa tuloksina saatiin paljon uutta tietoa mediumin merkityksestä Schwannin solujen kasvulle, solumäärästä ja BrdU:n vaikutusajasta. Solujen kasvu näkyi tasaisena absorbanssilukemana. Punaisella D-MEM proliferaatiomediumilla kasvatetut solut antoivat korkeampia absorbanssituloksia kuin värittömällä D-MEM proliferaatiomediumilla kasvatetut solut. Mediumin valinnalla todettiin olevan suuri merkitys Schwannin solujen kasvattamisessa. Parhaimmaksi solumääräksi osoittautui 6000 solua/kaivo. 20 000 solua/kaivo oli liikaa päivän 4 mittauksissa, koska solujen jakaantuminen oli pysähtynyt/taantunut. 50 000 solua/kaivo solut olivat pienissä kasoissa kuopilla ja ne olivat huonon näköisiä. Todettiin, että 6000 solua/kaivo absorbanssilukemat olivat sekä päivänä 2 että 4 sopivat erilaisten aineiden testaamiseen, jolloin aineiden mahdolliset vaikutukset olisivat vielä havaittavissa. Jatkossa oli kuitenkin tarkoitus testata useammalta potilaalta saatuja kasvaimia ja samankin potilaan eri kasvainten solut kasvavat hieman eri tahtiin. Valitun solumäärän absorbanssilukemat sallisivat tällaisen vaihtelun. Saatu tulos toistettiin kertaalleen. Tulokset on esitetty kuviossa 14 ja 15.





Kuvio 14. Medium, solumäärä ja BrdU:n vaikutusaikatestaus päivänä 2. Päivän 2 mittaustuloksissa oli käytetty BrdU:n vaikutusaikana 18 h. Tuloksista oli todettavissa, että punainen D-MEM proliferaatiomedium lisäsi selvästi Schwannin solujen kasvua. Päivän 2 mittaustuloksissa solumäärien 6000 – 20 000 absorbanssilukemat olivat hyvät erilaisten aineiden testaukseen.



Kuvio 15. Medium, solumäärä ja BrdU:n vaikutusaikatestaus päivänä 4. Päivän 4 mittaustuloksista oli parhaiten havaittavissa punaisen D-MEM:n solujen kasvua lisäävä vaikutus 6000 solua/kaivo kohdalla. Tulokset osoittivat sen, että jatkossa tulisi käyttää 6000 solua/kaivo, väritöntä D-MEM proliferaatiomediumia ja 18 h BrdU:n vaikutusaikaa.

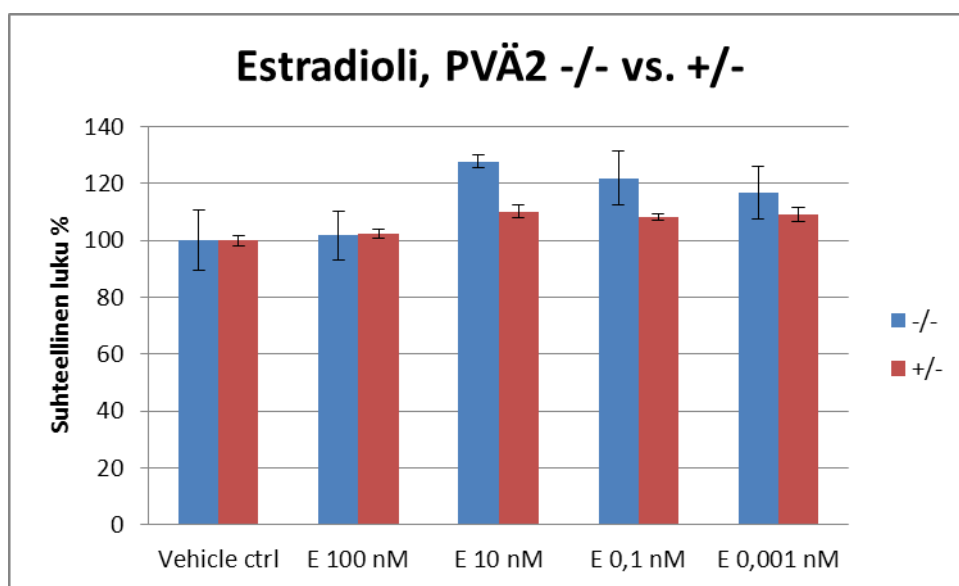
Edellä suoritettujen testauksien perusteella protokolla hormonien testaamisen Schwannin soluilla BrdU:n ELISA- määrittelyksellä 96-levyn kaivoilla oli mahdollistettu. Mediumina päätettiin käyttää väritöntä D-MEM

proliferaatiomediumia ilman forskoliinia. Solumääräksi valittiin 6000 solua/kaivo. ELISA- mittaukset tehtäisiin päivinä 2 ja 4 solujen pleittaamisesta. BrdU inkuboinniksi valittiin 18 tunnin vaikutusaika. Protokolla on opinnäytetyön liitteenä 3.

### 8.3 Hormonitestaukset

Protokolla löytymisen jälkeen voitiin aloittaa hormonien testaus Schwannin soluilla. Testattavina hormoneina olivat testosteroni,  $\beta$ -estradiol ja hCG. Estradioli ja testosteroni laimennettiin 96 % etanoliin sekä hCG laimennettiin steriiliin dH<sub>2</sub>O:een.

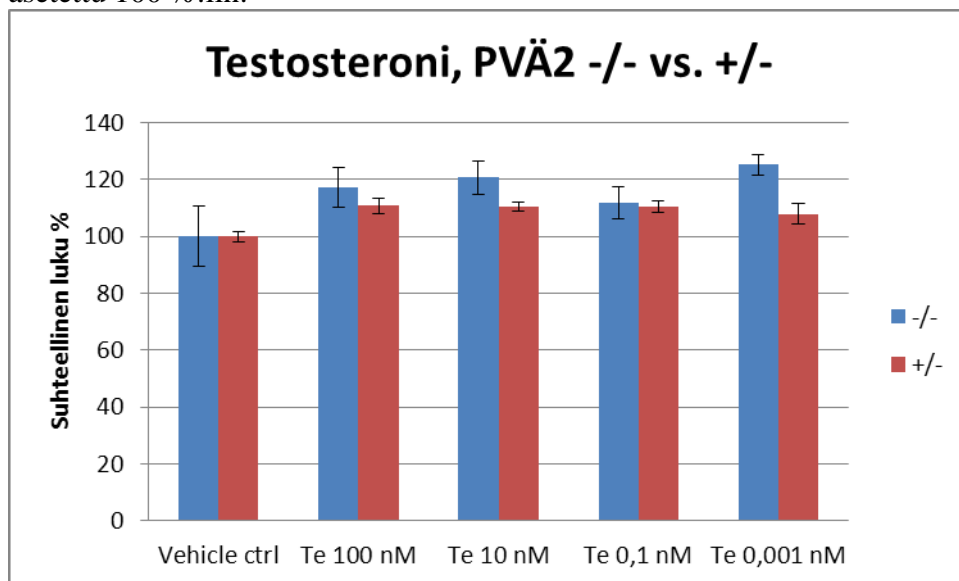
Tuloksina saatiin tietoa siitä, että estradiolilla ja testosteronilla oli Schwannin solujen jakaantumista lisäävä vaikutus. Molemmista testattiin pitoisuudet 0,001 nM – 100 nM. Hormoneita testattiin sekä +/- että -/- soluilla edellä kerrotun protokollan mukaisesti. Merkittävää oli, että hormoneilla oli suurin vaikutus -/- soluihin. Estradiolilla ja testosteronilla solujen jakaantumista eniten lisäävä vaikutus näkyi pitoisuudessa 10 nM. Hormonien vaikutus näkyi suurempana päivänä 4 kuin päivänä 2. Tulokset on esitetty kuvissa 16, 17, 18 ja 19.



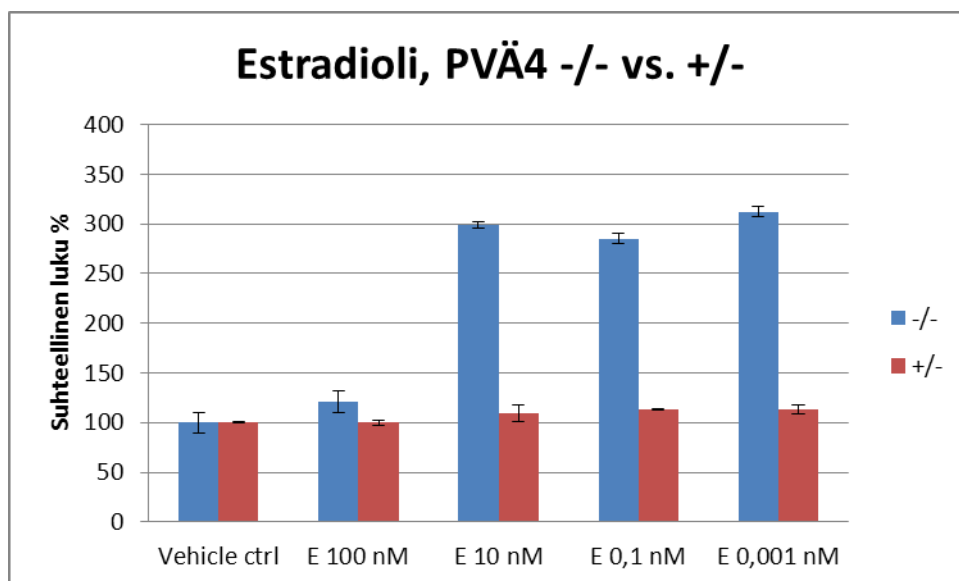
Kuvio 16. Estradiolin vaikutus Schwannin solujen kasvuun päivänä 2. Päivän 2 tuloksista voitiin todeta, että estradiolilla oli vaikutusta sekä -/- solujen että +/- solujen kasvuun. -/- solujen kasvu lisääntyi noin 10 - 20 % ja +/- solujen 10 %.



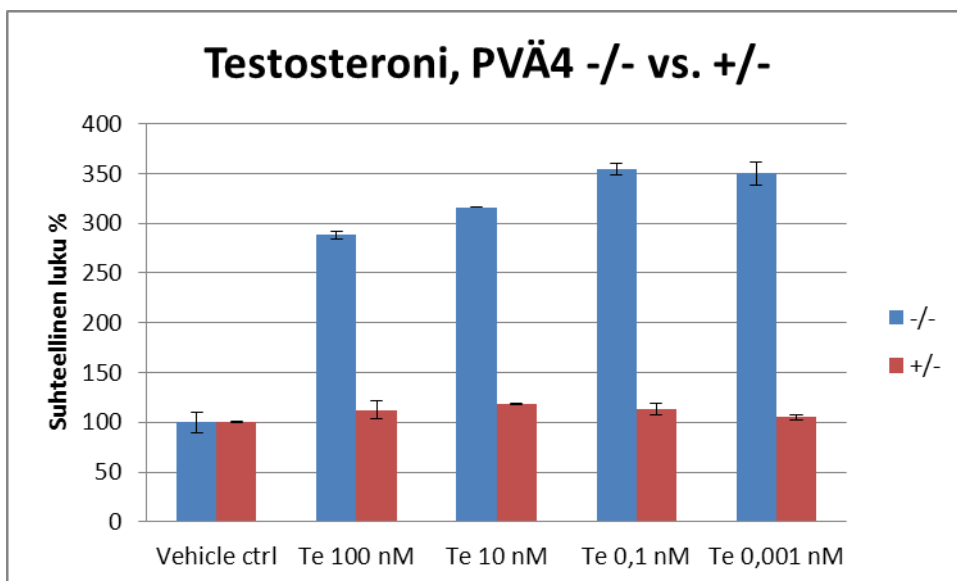
Vehicle ctrl tarkoittaa solujen kasvua ilman hormonien vaikutusta. Vehiclen arvo on asetettu 100 %:iin.



Kuvio 17. Testosteronin vaikutus Schwannin solujen kasvuun päivän 2 viljelmissä. Testosteronilla oli myös solujen kasvua lisäävä vaikutus siten, että -/- solujen kasvu lisääntyi noin 10 - 20 % ja +/- solujen 10 %. Vehiclen arvo on asetettu 100 %:iin.

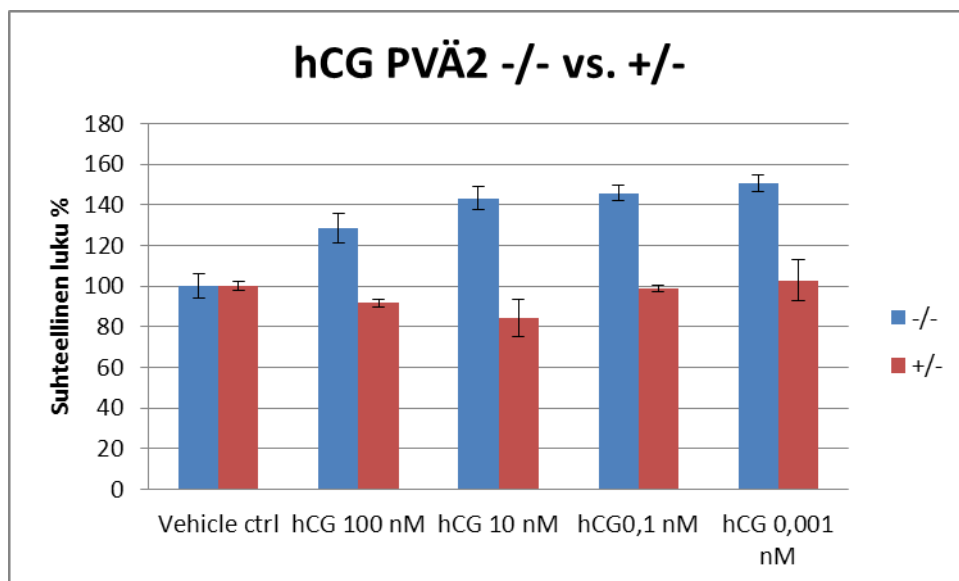


Kuvio 18. Estradiolin vaikutus Schwannin solujen kasvuun päivän 4 viljelmissä. Päivän 4 tuloksissa Schwannin solujen kasvu lisääntyi jopa 200 %:lla pitoisuuksissa 0,001- 10 nM -/- soluilla. 0,001 – 10 nM pitoisuudet lisäsivät +/- solujen kasvua vain noin 10 %. Vehiclen arvo on asetettu 100 %:iin.

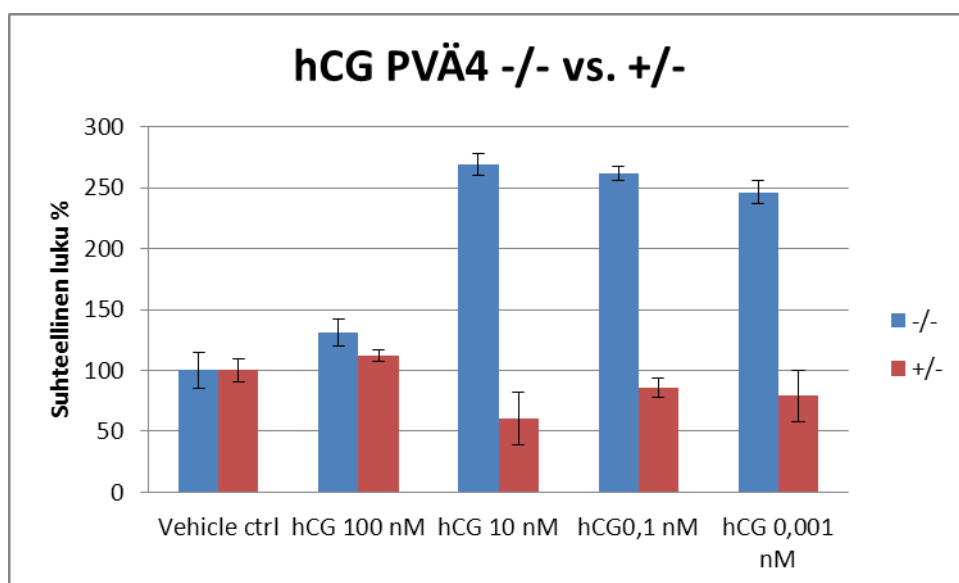


Kuvio 19. Testosteronin vaikutus Schwannin solujen kasvuun päivänä 4. Testosteroni lisäsi -/- Schwannin solujen kasvua 200 - 250% kaikilla testatuilla pitoisuuksilla päivän 4 mittaustuloksissa. Testosteronin vaikutus +/- soluihin on vähäinen. Vehiclen arvo on asetettu 100 %:iin.

Seuraavaksi testattiin hCG hormonia samoilla pitoisuuksilla kuin estradiolia ja testosteronia testattiin eli 0,001 nM – 100 nM. Hormoneita testattiin sekä +/- että -/- Schwannin solukannoilla. Merkittävää oli, että hCG:lla oli Schwannin solujen kasvua stimuloiva vaikutus sekä päivän 2 että 4 mittauksissa -/- soluihin ja inhiboiva vaikutus +/- soluihin. Tulokset on havainnollistettu kuvissa 20 ja 21.



Kuvio 20. HCG:n vaikutus Schwannin solujen kasvuun päivänä 2. Päivän 2 mittauksissa on huomioitavissa se, että hCG stimuloi -/- solujen kasvamista 30 – 50 % ja inhiboi noin 10 % +/- solujen kasvamista. Vehicle arvo on 100%.



Kuvio 21. HCG:n vaikutus Schwannin solujen kasvuun päivänä 4. Päivän 4 tuloksissa Schwannin solujen kasvu lisääntyi noin 160 %:lla pitoisuuksissa 0,001-10 nM -/- soluilla. Mielenkiintoista oli, että hCG inhiboi +/- Schwannin solujen kasvua 15 – 40 %.

## 9 YHTEENVETO JA POHDINTA

Ihon hyvänlaatuisten kasvaimien ja hormonien tutkiminen Schwannin soluilla soluviljelymenetelmin on jo pitkään ollut mielenkiinnon kohteena, mutta silti siitä on julkaistu aika vähän tuloksia. Tutkimukset osoittivat, että Schwannin soluilla pystytään tekemään tarkkojakin soluviljelymääryksiä. Tätä tietoa ei ollut tutkimusryhmäsämme ennen näiden tutkimusten tekemistä. Tutkimuksen tavoitteet täyttyivät hyvin. Suunnittelin ja kehitin itsenäisesti protokollan hormonitestauksia varten Schwannin soluilla.

Opinnäytetyöni yhtenä tavoitteena oli opetella viljelemään Schwannin soluja ja opetella tunnistamaan solujen +/- ja -/- kannat. Tutkimusryhmässä käytettyä solujen viljelyprotokollaa tuli myös kehittää mahdollisuuksien mukaan. Viljelyprotokollan ja solukantojen tunnistamisen opettelun jälkeen viljelyprotokollassa oli hieman kehittämisen varaa. Pullovaiheessa olevien viljelmien kasvatusnesteestä vaihdettiin vain puolet tilavuudesta, koska tutkimuksen aikana tuli ilmi, että solut kasvoivat siten paremmin. Aikaisemmin viljelmistä oli vaihdettu lähes aina koko mediumtilavuus kerralla. Passagessa 0 oli hyvä vaihtaa koko mediumtilavuus, koska viljelmässä oli paljon irtonaisia soluja sekä pieniä kudospaloja. Isommissa passageissa viljelmät olivat puhtaamman näköisiä, joten silloin ei ollut tarvetta vaihtaa koko tilavuutta kasvatusnesteeksi. Oletuksena oli, että solut erittivät tärkeitä aineita toisilleen kasvatusnesteessä. Toinen muutos protokollassa oli se, että dissociation medium pestiin pois. Kasvainten palasien hajotuksesta sentrifugoitu solupelletti suspensoitiin D-MEM:llä ja solut sentrifugoitiin uudelleen. Solut puhdistettiin dissociation eli hajotusmediumista. Aikaisemmin pesua ei ollut tehty.

Schwannin solujen -/- ja +/- kantojen rakenne on toisistaan huomattavasti poikkeava. Tutkimustulokset osoittivat, että -/- soluilla tehdyt jatkotutkimukset kannattaa ajoittaa passagella 2 - 5 tehtyihin viljelmiin, kun taas +/- soluilla tutkimuksia voidaan jatkaa tarvittaessa pidempään. Schwannin solujen -/- solujen kasvupotentiaali alkaa loppua passagen 5 jälkeen. Soluja voidaan yrittää elvyttää forskoliinia sisältävällä proliferaatiomediumilla, mutta avun vaikutus on hyvin lyhytaikainen tai riittämätön ELISA-määrittystä varten. Todettiin, että -/- solut olivat puhtaampia Schwannin so-

luviljelmii kuin +/- solut. Testauksien ajoittaminen alkuvaiheen passageihin tuottaa parhaan tuloksen.

Yksi tärkeimmistä tutkimustuloksista oli se, että on erittäin oleellista huomioida D-MEM:n koostumus testattaessa aineita Schwannin soluilla. Tutkimusryhmässämme oli aina kasvatettu soluja punaisella D-MEM – mediumilla. Tiesin aikaisemmista tutkimuksista johtuen sen, että hormonitestaukset tulisi tehdä värittömällä mediumilla. D-MEM:ssä punaisena väriaineena oleva fenolin puna on estrogeenin kaltainen jäljittelijä ja sen rakenne muistuttaa huomattavan paljon estrogeenin rakennetta. Siitä syystä fenolin puna tarttuu helposti Schwannin solujen estrogeenireseptoriin. Punainen D-MEM lisäsi Schwannin solujen kasvua jopa 50 prosenttia, jolloin hormonitestauksien lähtökohta Schwannin solujen kasvuksi olisi ollut liian korkea absorbanssilukemia ajatellen. Schwannin soluja kannattaa kasvattaa jatkossakin punaisessa D-MEM proliferaatiomediumissa, mutta hormonitestaukset ja muut ainetestaukset pitäisi tehdä jatkossa värittömässä D-MEM proliferaatiomediumissa. Tutkimuksen aikana huomattiin myös, että Schwannin solut eivät olisi kasvaneet kovin hyvin tai niin useita passageita värittömässä D-MEM proliferaatiomediumissa.

Schwannin solujen viljelyssä täytyy huomioida myös se, että eri potilaiden yksittäiset tuumorit kasvavat kukin omaa tahtiaan. Viljelmät tarvitsevat jatkuvaa seuraamista, sillä kasvatusalustan täytyttyä 70 – 80 prosenttisesti, täytyy viljelmiä jakaa uudelle kasvatusalustalle. Hormonitestauksissa oli puolestaan tärkeää, että kaivot eivät saaneet olla liian täynnä soluja päivänä 4, koska testattavien aineiden inhiboiva tai stimuloiva vaikutus pitäisi olla selvästi havaittavissa.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää vaikuttaako ihon hyvänlaatuisten kasvaimien syntyyn ja lisääntymiseen jokin hormonaalinen tekijä murrosiässä, raskauden ja vaihdevuosien aikana. Sukupuolihormonit vaikuttavat ihmisen eri ikäkausissa sekä miehiin että naisiin. Tutkimuksessa testattavia hormoneita löytyy molemmista sukupuolista eri pitoisuuksia. Tutkimuksen tulokset antoivat uutta tietoa +/- solujen ja +/- solujen käyttäytymisestä estradiolin, testosteronin ja hCG:n läsnä ollessa. Hormonit näyttivät tutkimustulosten perusteella vaikuttavan pääasiassa +/- solujen kasvun lisääntymiseen. Näiden solujen kasvu lisääntyi päivän 4 viljelmissä jopa yli 200 %. Päivän 2 viljelmissä oli myös nähtävissä estradiolin ja testosteronin noin 10 - 20 %:n

stimulointi +/- solujen kasvamisessa. HCG puolestaan inhiboi +/- Schwannin solujen kasvua jopa 15 – 40 %. Tulokset osoittavat selkeästi, että NF1 -/- genotyypin Schwannin solut ovat erityisen herkkiä sukupuolihormonien vaikutuksille.

Jatkossa voisi testata hormonien vaikutusta Schwannin soluilla useammilla potilasnäytteillä. Jo yhden potilaan eri kasvainten solupopulaatiossa oli huomattavia eroja, mutta tehty protokolla huomioi näistä aiheutuvan vaihtelun. Olisi myös mielenkiintoista tutkia, kuinka estradioli ja hCG sekä testosteroni ja hCG reagoisivat yhdessä Schwannin solujen kasvuun. BrdU ELISA -menetelmää voisi tarvittaessa testata myös muihin tutkimusryhmässämme tehtäviin soluviljelmien soluihin.

## LÄHTEET

1. Overdiek A., Winner U., Mayatepek E. 2008. Schwann cells from human neurofibromas show increased proliferation rates under the influence of progesterone. *Pediatric Research* 64:40-43.
2. Ferner R. E. 2010. The Neurofibromatosis. *Pract Neurol* 10:82-93.
3. Peltonen J. & Jaakkola S. 1991. Neurofibromatoosi. *Duodecim* 107(14):1126-1134.
4. Kam J. R. & Helm T. N. 2009. Neurofibromatosis.  
<http://emedicine.medscape.com/article/1112001-overview>
5. Koulu M. & Tuomisto J. 7/2010. Farmakologia ja toksikologia. Gonadotropiinit ja sukupuolihormonit ja niiden vastavaikuttajat. S.667–711.
6. Rutanen E. & Ylikorkala O. 2004: Vaihdevuosisien hormonihoito. Kapseli 33. Lääkelaitos ja Kela.
7. Nienstedt W. & al. 2004. Ihmisen fysiologia ja anatomia. WSOY.
8. Drake R.L., Vogl W. & Mitchell A.W.M. 2005. Gray's Anatomy for Students. Elsevier Inc.
9. Elektroninen lähde: <https://webapps.jyu.fi/koppa>
10. Kimberly J. & Friedman J. M. 2010. Clinical and Genetic Aspects of Neurofibromatosis 1. *Genetics in Medicine*.
11. Ranne S. 2009. Neurofibromatoosi tyyppi 1 ja suun muutokset. Kliininen laitos/ihotautioppi. Lääketieteellinen tiedekunta. Turun yliopisto.
12. Heervä E. 2007. Neurofibromatoosi tyyppi 1 ja kasvoluiden muutokset. Biolääketieteen laitos/anatomia. Turun yliopisto.
13. Serra E. & al. 2000. Schwann Cells Harbor the Somatic NF1 Mutation in Neurofibromas: Evidence of Two Different Cell Subpopulations. *Human Molecular Genetics* 9(20): 3055-3064.
14. Koivunen J. & al. 2000. New function for NF1 tumor suppressor. *J Invest Dermatol* 114: 473–479.
15. Gottfried O. N. 2006. Molecular, Genetic, and Cellular Pathogenesis of Neurofibromas and Surgical Implications. *Neurosurgery* 58: 1-16.
16. Cichowski K. & Jacks T. 2001. NF1 Tumor Suppressor Gene Function: Narrowing the GAP. *Cell* 104: 593-604.

17. Maghni K., Nicolescu O. M., Martin J.G. 1998. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *Journal of immunological methods* 223(1999):185-194.
18. Sauerzweig S. & al. 2008. Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker. *Journal of neuroscience methods* 177(2009):149-159.
19. Rosenbaum T. & al. 2000. Long-term culture and characterization of human neurofibroma-derived Schwann cells. *Journal of neuroscience research* 61: 524–532.
20. Corfas G. & al. 2004. Mechanism and roles of axon-Schwann cell interactions. Annual meeting Symposium. *The journal of neuroscience* 24(42):9250-9260.
21. Peltonen J. & Peltonen S. 1991. Miten hermot kestävät – hermon sidekudoksen rakenne ja toiminta. *Duodecim* 107:1397–1403.
22. Berthois Y. & al. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83(8):2496–2500.
23. Welshons W. V. & al. 1988. Estrogen activity of phenol red. *Molecular and cellular endocrinology.* 57:169–178.
24. Rahmatullah H. H. & al. 1998. Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin. *Molecular and cellular biology.* 6245-6252.
25. Nebesio T. D. & al. 2007. Neurofibromin – deficient Schwann cells have increased lysophosphatidic acid dependent survival and migration- Implications for increased neurofibroma formation during pregnancy. *Glia* 55:527-536.
26. Nowakowski R. S. and Miller M. W. 1988. Use of Bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain. res.* 457(1): 44-52.



## Schwannin solut

### A) Neurofibroomien käsittely ja preinkubointi (keskiviikko tai perjantai)

1. Tuumori haetaan TYKS:stä ja laitetaan 15ml:n falconiin, jossa on n. 3ml RPMI- mediumia (Gibco RPMI 1640) ja 1/10 osa penicillin streptomyciniä (Gibco). (Ota mukaan pasteur-pipettejä, 15 ml:n falconputkia, sekä nestetyppeä ja foliota isompia tuumoreita varten → laitetaan -70 °C:een.)
2. Merkkää ylös potilaan numero, tuumorin numero ja se, mistä tuumori on ope-roitu. ( Esim. E26, TU30, niska.)

Seuraavat työvaiheet tehdään soluviljelyssä laminaarikaapissa:

3. ”Kippaa” tuumori RPMI- mediuimeineen lasimaljalle. Poista iho kasvaimesta ja pilko tuumori noin Ø 3mm:n paloiksi.
4. Siirrä tuumorin palat 50ml:n falconiin, jossa on preinkubaatiomediumia. (Isoille paloille 10 ml mediumia ja pienille paloille 5 ml mediumia.)
5. Preinkuboi kasvainta n. 3-5 vrk 5 % CO<sub>2</sub>-kaapissa +37 °C:ssa.

#### Preinkubaatiomedium 10 ml:

DMEM	8,5 ml
FBS (inaktivoimaton USA)	1 ml (10 %)
Penicillin Streptomycin	500 µl (5%, 500 U/ml)
Forskolin (10mM)	2 µl (2µM)
Fungizone	50 µl (1:100–1:1000; <u>1:200</u> )

### B) Kasvaimen/kudoksen kemiallinen ja mekaaninen hajotus (maanantai)

1. Ime preinkubaatiomedium pois ja pipetoi 3-6ml dissociation mediumia.
2. Inkuboi 18–24 h 5 % CO<sub>2</sub>-kaapissa +37 °C:ssa.

#### Dissociation medium 10 ml:

DMEM	7,4 ml
FBS (inaktivoimaton USA)	1 ml (10%)
Collagenaasi type1 (10mg/ml)	1,28 ml (160 U/ml)
Dispaasi (grade 1) (20U/ml)*	400 µl (0.8 U/ml)

\* lyofilisoitu jauhe liuotettu 2 ml:aan (HUOM! Plossa 40U/mg) dH<sub>2</sub>O, jolloin saadaan 25x Stock

**C) Viljelypullojen, -maljojen tai -levyjen couttaus lysiinillä (maanantai)**

*Päällystysaineet matkivat soluväliainetta. Päällystetyt viljelyalustat säilyvät jääkaapissa viikon.*

1. Päällystä viljelyalustat Poly-L-lysiinillä 1mg/ml steriiliä 1 x PBS:a tunnin ajan RT°. (Stock: 50 mg/ml eli 200µl/10ml)
2. Pese 1 x PBS:llä
3. Lisää laminiiniliuos 4 µg/ml 1x PBS 20 min - 1h +37 °C:ssa. (50µl/10ml)
4. Pese 1 x PBS:llä.

**D) Schwannin solujen viljely (tiistai)**

1. Hajota kasvaimen palaset suspensoimalla ensin 5 ml:n pipetillä ja sitten 100µl pipetin kärjellä ja pipetillä.
2. Fuugaa 1200 rpm/ 10 min
3. Ime dissociation medium pois ja suspensoi solupelletti 5ml:aan DMEM:ä.
4. Fuugaa 1200 rpm/10 min
5. Ime medium pois ja pipetoi solupelletille +/- proliferaatiomediumia tarvittava määrä sekä suspensoi. (1 tuumorin solut + 3ml mediumia, 2:lle 6-kaivon levyn kuopalle; a' 1,5ml mediumsolususpensiota)
6. Jaa solususpensio **coutatuille** kasvatusalustoille. (pienestä kasvaimesta kaikki solususpensio kahdelle 6-kaivon levyn kaivolle. Jne....)
7. Vaihda medium 2 vrk:n kuluttua samalla +/- soluille, kun laitat puolelle soluista -/- mediumin. (torstai)

**Proliferaatiomedium 10ml (SC+/-):**

DMEM	9 ml
FBS USA (ei i)	1 ml (10 %)
PS	100 µl (100 U/ml; 1 %)
IBMX (1 M DMSO:ssa)	5 µl (0,5 mM)
Beta1-herregulin (5 µM)	20 µl (10 nm)
Insulin (2 mg/ml)	12,5 µl (2.5 µg/ml)
Forskolin (10mM)	0,5 µl (0,5 µM)*

**Proliferaatiomedium 10ml (SC-/-):**

DMEM	9 ml
FBS USA (ei i)	1 ml (10 %)
PS	100µl (100 U/ml; 1 %)
IBMX (1 M DMSO:ssa)	5 µl (0,5 mM)
Beta1-herregulin (5 µM)	20 µl (10 nm)
Insulin (2 mg/ml)	12,5 µl (2.5 µg/ml)

*\*Forskoliini stokin (10mM) voi laimentaa 1:10. Laimennosta laitetaan 5µl/10ml:aan mediumia.*

**E) NF1 +/- solujen käsittely seuraavasta päivästä alkaen** (keskiviikko ja torstai)

1. Vaihda niille soluille seerumivapaa N2-medium, jotka haluat rikastaa +/- soluiksi. Ime +/- medium pois ja lisää N2 mediumia. Inkuboi 5 % CO<sub>2</sub> +37 °C:ssa yön yli.

**N2- medium 10ml (SC/-):**

DMEM	7,3 ml (73 %)
F12	2,5 ml (25 %)
PS	100 µl (100 U/ml; 1 %)
N2-supplement	100 µl (1 %)

2. Vaihda seuraavana päivänä +/- soluille ilman forskoliinia oleva proliferaatiomedium. Vaihda samalla +/- soluille medium.
3. Vaihda medium joka 3. tai 4. päivä.
4. Solut irrotetaan 0,05 % trypsin-EDTA:lla, kun kaivosta on n.70 - 80 % konfluentti, ja jaetaan uusiin kaivoihin. (Muista coutatuille kasvualustoille!)

**Trypsinointi:** Trypsiini-EDTA sulatetaan lämpökaapissa (+37 °C). Mediumit imetään pois kasvualustoista ja soluja pestään kerran steriilillä 1 x PBS:llä, minkä jälkeen solujen päälle pipetoitiin trypsiini-EDTA- liuosta (6-kaivon levyn kuopalle 1ml, T25 plolle 2 ml). Trypsiinin annetaan vaikuttaa hiilidioksidikaapissa noin 5 min. Solujen irtoamista seurataan mikroskoopilla. Levyä tai pulloa ravistellaan voimakkaasti solujen irtoamisen edistämiseksi. Kun solut ovat irronneet, trypsiini-EDTA inaktivoidaan seerumia sisältävällä mediumilla (DMEM + 10 % FBS) ja sentrifugoidaan pois (1000 rpm, 10 min).

## LIITE 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Vehicle ctrl	Vehicle ctrl	Vehicle ctrl	Vehicle ctrl	E 10 <sup>-7</sup>	E 10 <sup>-7</sup>	E 10 <sup>-7</sup>	E 10 <sup>-7</sup>	
B	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	
C	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	
D	Te 10 <sup>-12</sup>	Te 10 <sup>-12</sup>	Te 10 <sup>-12</sup>	Te 10 <sup>-12</sup>									-/- solut
E	Blank	Blank	Blank	Blank	Vehicle ctrl	Vehicle ctrl	Vehicle ctrl	Vehicle ctrl	E 10 <sup>-7</sup>	E 10 <sup>-7</sup>	E 10 <sup>-7</sup>	E 10 <sup>-7</sup>	+/- solut
F	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-8</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-10</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	E 10 <sup>-12</sup>	
G	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-7</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-8</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	Te 10 <sup>-10</sup>	
H	Te 10 <sup>-12</sup>	Te 10 <sup>-12</sup>	Te 10 <sup>-12</sup>	Te 10 <sup>-12</sup>									

	Blank	Vehicle ctrl
Viljelymedium	100 µl	100 µl
Solumäärä	-	6000
BrdU	10 µl	10 µl
Etanoli	0,1 µl	0,1 µl

**TEST X****Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) VKOX**

(Cat. No. 11 647 229 001, Roche)

**Dilute BrdU labelling reagent (bottle 1) 1:100 with sterile culture medium**

5µl BrdU + 495µl culture medium (resulting concentration: 100µM BrdU, store at -20°C).

Ready diluted in -20°C

**Day 0; Plate the cells!**

Plate the cells in 100 µl medium into 96-well micro-titer-plate (flat-bottomed). (100µl/well)

**Plate 2 plates:**

2 plates with day 2 and 4

**Number of cells:** (n = 4)

6000

1. Add day 1 and 3 **10 µl of BrdU labelling solution** at 03.00pm to 100µl well and incubate 18h +37°C.

2. After 18 (at 09.00am) hour incubation tap micro plate to remove labelling medium.

3. Add **200µl/well FixDenat solution** (bottle 2) and incubate **30 min RT °C**

4. Tap micro plate to remove FixDenat.

5. Add **Blocking reagent 200 µl/well** and incubate **30 min RT °C** [dilute the aliquots in -20C- 1:10 with sterile dist water. For 96-well block 2ml+18ml dH<sub>2</sub>O]

6. Tap micro plate to remove Blocking reagent.

**7. Dilute Anti-BrdU-POD stock solution 1:100 with antibody dilution solution** (for 96 well: 100µl Anti-BrdU-POD + 9900µl of ant.dil sol)

8. Add **100µl/well Anti-BrdU-POD antibody working solution** and incubate **60 min RT °C**

9. Tap micro plate to remove antibody conjugate

10. **Wash** micro plate with **1 X PBS 250µl/well. TWO quick rinse and then 3 x 5 min RT°C** (Remove washing solution by tapping; washing buffer concentrate was diluted 1:10 in double-distilled water)

11. Tap micro plate to remove washing solution.

12. Add **100µl/well Substrate** and incubate **30 min RT°C**.

**Measurements**

13. Then add the stop solution 25µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and incubate 1 min. on the shaker. Measure the absorbance at 450nm within 5 min.